

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**“Μικροβιολογικές μεταβολές και εμπορικός χρόνος ζωής  
φιλέτων τσιπούρας (*Sparus aurata*)  
κατά την αποθήκευση τους σε υπέρψυξη.”**



**Σακελλαρίου Ασπασία**

**ΒΟΛΟΣ 2017**

**“Μικροβιολογικές μεταβολές και εμπορικός χρόνος ζωής φιλέτων τσιπούρας (*Sparus aurata*) κατά την αποθήκευσή τους σε υπέρψυξη.”**



«Όποιος δεν ξέρει και δεν ξέρει πως δεν ξέρει, είναι τρελός,  
απόφυγε τον.

Όποιος δεν ξέρει και ξέρει πως δεν ξέρει, είναι παιδί, μόρφωσέ το.

Όποιος ξέρει και δεν ξέρει πως ξέρει, κοιμάται, ξύπνα τον.

Όποιος ξέρει και ξέρει πως ξέρει, είναι σοφός, ακολούθησε τον».

Χαλίλ Γκιμπράν (1883-1931)

**Διμελής εξεταστική επιτροπή:**

**1) Ιωάννης Μποζιάρης (M.Sc., Ph.D.),** Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.

**2) Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης (M.Sc., Ph.D.),** Επίκουρος Καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην εκπόνηση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας. Ιδιαίτερα οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Μποζιάρη, τόσο για την πολύτιμη βοήθειά του και τις συμβουλές του όσο και για την υποστήριξη και εμπιστοσύνη προς μέρους μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, μέλος της εξεταστικής μου επιτροπής, για τη χρήσιμη συμβολή του στην διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας.

Ένα ακόμη πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην κα Φωτεινή Παρλαπάνη και στον κ. Σωτήρη Οικονόμου για την πολύτιμη και ανιδιοτελή βοήθειά τους και συμπαράστασή τους κατά τη διεξαγωγή της εργασίας αυτής.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου τόσο στην οικογένειά μου όσο και στους ανθρώπους που ήταν κοντά μου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, για την στήριξη και την κατανόηση τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ψάρια αποτελούν προϊόντα υψηλής βιολογικής αξίας. Τα νωπά αλιευτικά προϊόντα είναι ιδιαίτερα ευπαθή και ευαλλοίωτα. Η αποθήκευση των ψαριών σε χαμηλές θερμοκρασίες αποτελεί τον πιο συνήθη τρόπο αποθήκευσης που χρησιμοποιείται το τελευταίο καιρό για την καθυστέρηση της αλλοίωσης των νωπών ψαριών. Η αλλοίωση οφείλεται σε τρεις παράγοντες, τη μικροβιακή δραστηριότητα, τη χημική οξείδωση των λιπιδίων και την αυτόλυση. Η μικροβιακή δραστηριότητα είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός που επηρεάζει την ποιότητα των νωπών ψαριών, καθώς η υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών σχετίζεται άμεσα με την κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών, που περιέχονται στους ιχθύες, από μια ομάδα βακτηρίων γνωστοί ως Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Οργανισμοί (SSOs).

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των οργανοληπτικών και μικροβιολογικών μεταβολών φιλέτων τσιπούρας (*Sparus aurata*), αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης και υπέρψυξης (superchilling) στους 2 °C και στους -1,5 °C αντίστοιχα, με στόχο την εκτίμηση της ποιότητας και του εμπορικού χρόνου ζωής τους. Μετρήσεις με σκοπό τις οργανοληπτικές και μικροβιολογικές αναλύσεις λαμβάνονταν για τα φιλέτα τσιπούρας που ήταν αποθηκευμένα στους 2 °C κάθε τρεις (3) ημέρες ενώ για τα φιλέτα τσιπούρας που ήταν αποθηκευμένα στους -1,5 °C κάθε πέντε (5) ημέρες.

Έπειτα από οργανοληπτική αξιολόγηση ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων τσιπούρας προσδιορίστηκε στις 6 ημέρες (144h) για τα φιλέτα που ήταν αποθηκευμένα στους 2 °C και στις 15 ημέρες (360h) για τα φιλέτα που ήταν αποθηκευμένα στους -1,5 °C. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H<sub>2</sub>S) (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*) αποτέλεσαν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς αλλοίωσης των φιλέτων και στις δύο θερμοκρασίες. Τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και οι μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta* αποτέλεσαν επίσης μέρος της μικροβιακής χλωρίδας των φιλέτων, χωρίς όμως να αναπτυχθούν σε πολύ υψηλά επίπεδα πληθυσμού σε σχέση με τους παραπάνω μικροοργανισμούς. Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα ανερχόταν σε 7,84 log cfu/g και 7,67 log cfu/g για τα φιλέτα που ήταν αποθηκευμένα στους 2 °C και στους -1,5 °C έπειτα από 6 (144h) και 15 (360h) ημέρες αποθήκευσης αντίστοιχα.

Τέλος, οι διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης φαίνεται να επηρέασαν τους ρυθμούς ανάπτυξης των μικροοργανισμών, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως επίσης και την διάρκεια του εμπορικού ζωής των φιλέτων τσιπούρας.

**Λέξεις-κλειδιά:** Τσιπούρα (*Sparus aurata*), Εμπορικός χρόνος ζωής, Ψύξη, Υπέρψυξη, Αλλοίωση, Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ).

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Στοιχεία βιολογίας τσιπούρας.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Συστηματική κατάταξη τσιπούρας .....	1
1.1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά τσιπούρας .....	1
1.1.3. Περιβάλλον διαβίωσης .....	2
1.1.4. Αναπαραγωγή .....	3
<b>1.2. Σημασία τσιπούρας για τις υδατοκαλλιέργειες.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Διατροφική αξία ιχθύων.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Φρεσκότητα και διάρκεια ζωής τροφίμων.....</b>	<b>6</b>
<b>1.5. Αλλοίωση ιχθύων .....</b>	<b>7</b>
1.5.1. Μηχανισμοί αλλοίωσης ιχθύων .....	8
1.5.1.1. Αυτόλυση .....	8
1.5.1.2. Χημική οξείδωση .....	9
1.5.1.3. Μικροβιακή δραστηριότητα .....	10
1.5.1.3.1. Μικροβιακή σύνθεση ιχθύων αποθηκευμένων σε χαμηλές θερμοκρασίες .....	13
1.5.1.3.2. Ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (SSOs) .....	14
<b>1.6. Μέθοδοι συντήρησης ιχθύων .....</b>	<b>15</b>
1.6.1. Ψύξη .....	16
1.6.2. Υπέρψυξη (superchilling).....	17
1.6.3. Κατάψυξη .....	18
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Γενικός πειραματικός σχεδιασμός.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Μικροβιολογική ανάλυση .....</b>	<b>20</b>
2.2.1. Μικροβιολογικά υλικά .....	20
2.2.1.1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) .....	20
2.2.1.2. Βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i> .....	21
2.2.1.3. Βακτήρια της οικογένειας <i>Enterobacteriaceae</i> .....	22
2.2.1.4. Μικροοργανισμοί <i>Brochothrix thermosphacta</i> .....	23
2.2.1.5. Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο ( $H_2S$ ) .....	24
2.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων για καταμέτρηση της μικροβιακής χλωρίδας - παρασκευή αραιώσεων.....	25
2.2.3. Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών.....	27
<b>2.3. Οργανοληπτική ανάλυση.....</b>	<b>28</b>



<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Οργανοληπτική ανάλυση.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Μικροβιολογική σύνθεση .....</b>	<b>32</b>
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>36</b>
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>46</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>47</b>
<b>6.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία .....</b>	<b>47</b>
<b>6.2. Ηλεκτρονική βιβλιογραφία .....</b>	<b>57</b>
<b>6.3. Ελληνική βιβλιογραφία .....</b>	<b>57</b>
<b>7. ABSTRACT .....</b>	<b>58</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>59</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Στοιχεία βιολογίας τσιπούρας

### 1.1.1. Συστηματική κατάταξη τσιπούρας

Βασίλειο: *Animalia*

Φύλο: *Chordata*

Υποφύλο: *Vertebrata*

Υπερκλάση: *Osteichthyes*

Κλάση: *Actinopterygii*

Intraclass: *Teleostei*

Υπερτάξη: *Percoidei*

Οικογένεια: *Sparidae*

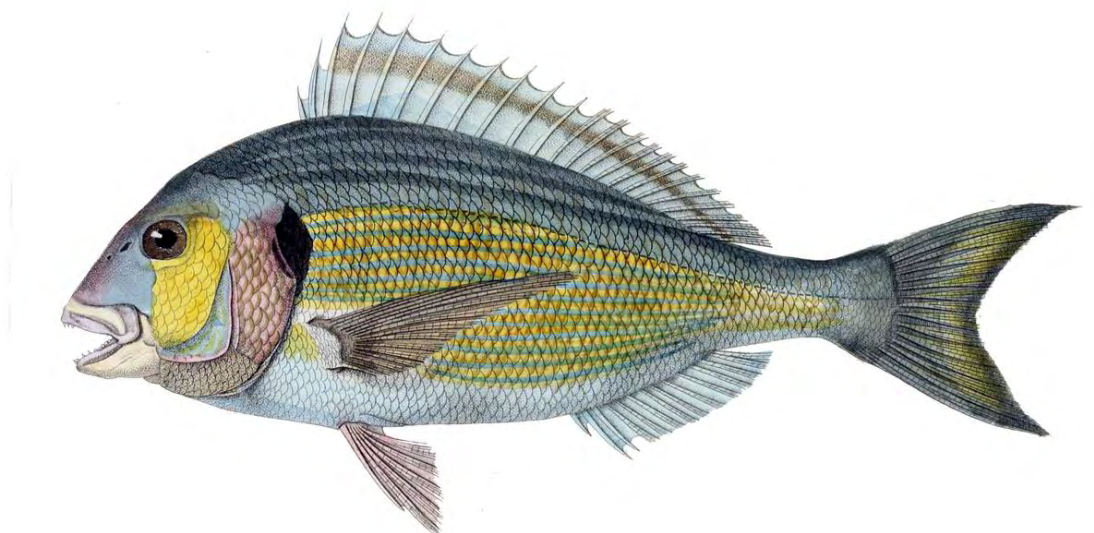
Γένος: *Sparus* Linnaeus, 1758

Είδος: *Sparus aurata* Linnaeus, 1758

### 1.1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά τσιπούρας

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) χαρακτηρίζεται από ένα υψηλό και πλευρικά συμπιεσμένο σώμα, με κυρτή κεφαλή, μικρά μάτια και ρύγχος ελαφρώς μεγαλύτερο από το διπλάσιο της διαμέτρου του ματιού. Το στόμα βρίσκεται χαμηλά και είναι ελαφρώς προτεταμένο, εφοδιασμένο με 2-4 σειρές δοντιών στην άνω σιαγόνα και 3-4 σειρές δοντιών στην κάτω. Το ραχιαίο πτερύγιο αποτελείται από 11 σκληρές και 13 μαλακές άκανθες και το ουραίο πτερύγιο από 3 σκληρές και 11 ή 12 μαλακές άκανθες. Ο αριθμός των λεπιών κατά μήκος της πλευρικής γραμμής κυμαίνονται από 73-75. Το χρώμα της είναι ασημί-γκρι, φέρει μια μαύρη κηλίδα στο βραγχιακό επικάλυμμα, στο

ύψος που ξεκινά η πλευρική γραμμή, μια πλατιά χρυσή λωρίδα ανάμεσα στα μάτια και συχνά σκούρες διαμήκεις γραμμές στις πλευρές του σώματος (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος 2012).



**Εικόνα 1.1.2.1.:** Απεικόνιση τσιπούρας.

### **1.1.3. Περιβάλλον διαβίωσης**

Στο φυσικό της περιβάλλον η τσιπούρα συναντάται τόσο σε θαλάσσια όσο και σε υφάλμυρα ύδατα, σε βάθος συνήθως έως και 150 μέτρων, σε περιοχές με υποτροπικό κλίμα και μέση θερμοκρασία 26 °C. Οι περιοχές που διαβιεί είναι ο Ανατολικός Ατλαντικός από τη Μεγάλη Βρετανία ως τη Σενεγάλη, η Μεσόγειος, καθώς υπάρχουν αναφορές και για την διαβίωσή της στη Μαύρη Θάλασσα.

Λόγω του γεγονότος ότι είναι ευρύθερμο και ευρύαλο είδος έχει τη δυνατότητα να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε περιοχές όπως οι παράκτιες λιμνοθάλασσες και οι εκβολές των ποταμών, ιδίως κατά τα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής του. Απαντάται σε περιοχές με θαλάσσια βλάστηση (π.χ. λιβάδια Ποσειδωνίας) και αμμώδη αλλά και βραχώδη βενθικά υποστρώματα.

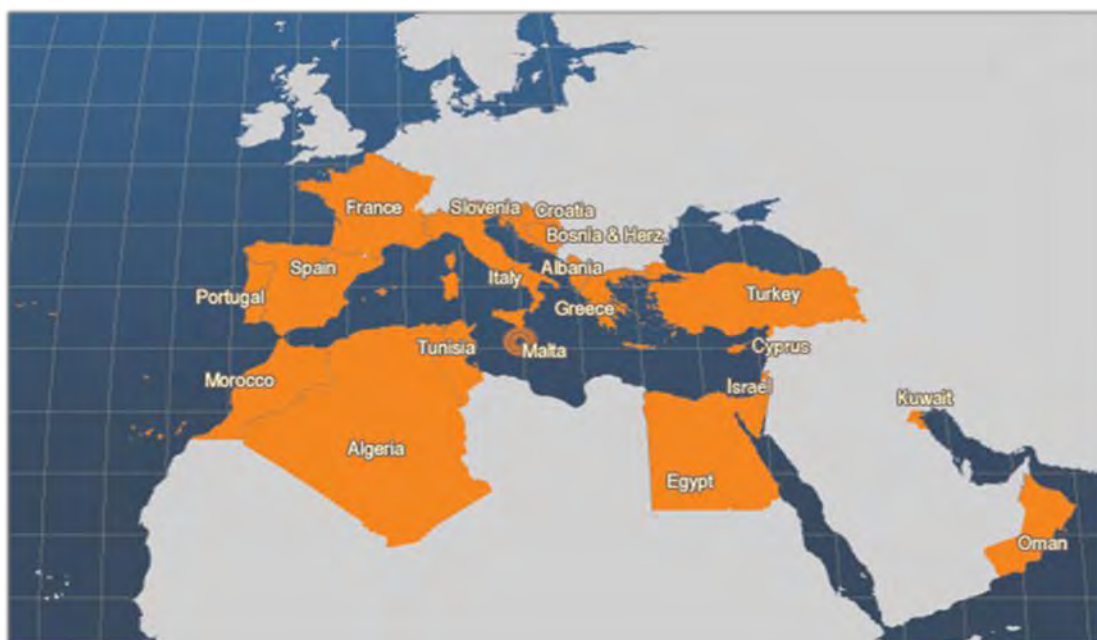
Εμφανίζεται μεμονωμένα είτε σε ομάδες μικρού αριθμού ατόμων και είναι κυρίως σαρκοφάγο είδος, τρεφόμενο με οστρακοειδή (μύδια, στρείδια), μαλάκια, πολύχαιτους. Η διάρκεια ζωής της άγριας τσιπούρας φτάνει τα 11 χρόνια (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος 2012).

#### **1.1.4. Αναπαραγωγή**

Η τσιπούρα είναι είδος πρωτανδρικό ερμαφρόδιτο, ωοτόκο, με περίοδο αναπαραγωγής από τον Οκτώβριο ως τον Δεκέμβριο. Στα δυο πρώτα χρόνια της ζωής της είναι αρσενικού φύλου ενώ έπειτα γίνεται η αναστροφή του φύλου, δηλαδή σε θηλυκό. Η ωοτοκία πραγματοποιείται στη θάλασσα κατά τη διάρκεια του χειμώνα και τα ιχθύδια συνήθως μεταναστεύουν νωρίς την άνοιξη προς τα προστατευόμενα παράκτια ύδατα, αναζητώντας άφθονη τροφή και πιο ήπιες θερμοκρασίες. Είναι πολύ ευαίσθητο στις χαμηλές θερμοκρασίες και στα τέλη του φθινοπώρου επιστρέφει στην ανοιχτή θάλασσα (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος 2012).

### **1.2. Σημασία τσιπούρας για τις υδατοκαλλιέργειες**

Η τσιπούρα αποτελεί ένα σημαντικό εμπορικό είδος για τη διατροφή του ανθρώπου και ένα από τα κυριότερα είδη ψαριών που εκτρέφονται στις περιοχές της Μεσογείου (Parlapani et al. 2013). Η τσιπούρα αποτελεί κατάλληλο είδος για εκτατική υδατοκαλλιέργεια στη Μεσόγειο, λόγω της υψηλής της εμπορικής αξίας, του υψηλού ποσοστού επιβίωσης και των διατροφικών της συνηθειών, που περιλαμβάνουν προϊόντα που βρίσκονται σχετικά χαμηλά στην τροφική αλυσίδα.

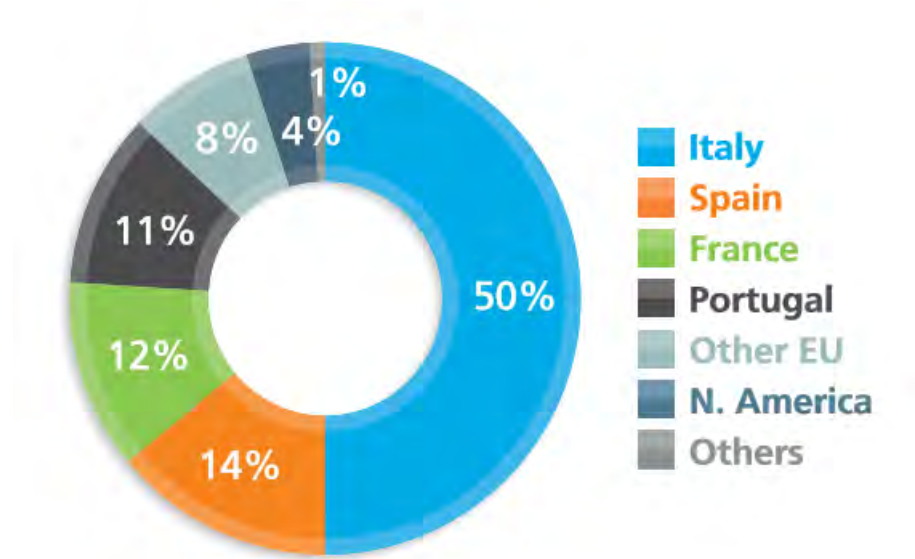


**Εικόνα 1.2.1.:** Κύριες χώρες παραγωγής τσιπούρας (FAO 2006).

Η εκτροφή της τσιπούρας αρχικά πραγματοποιούνταν σε παράκτιες λιμνοθάλασσες και λίμνες αλμυρού νερού με χρήση εκτατικού συστήματος εκτροφής, ώσπου τη δεκαετία του 1980 αναπτύχθηκαν τα συστήματα εντατικής εκτροφής, εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης για ψάρια. Έτσι πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας καλά οργανωμένης οικονομικής δραστηριότητας σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες και ιδιαίτερα στα ελληνικά ύδατα. Η Ελλάδα έγινε ένας από τους σημαντικότερους παραγωγούς ιχθύων υδατοκαλλιέργειας στην Ευρώπη και στη Μεσόγειο, με την ελληνική υδατοκαλλιέργεια να χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλη αύξηση της παραγωγής, σημαντική αύξηση του αριθμού των υδατικών εκμεταλλεύσεων και υψηλό επίπεδο κερδοφορίας, με κύρια παραγόμενα προϊόντα την τσιπούρα και το λαβράκι (Vlachvei 2002).

Η θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια γνώρισε ταχεία ανάπτυξη στην Ελλάδα με τη χρήση πλωτών κλωβών τη δεκαετία του '80 και συνέχισε να αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς. Το 2015, η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού υπολογίστηκε σε 110,000 τόνους, οι οποίοι κάλυψαν το 61% της ζήτησης στην Ευρώπη και το 31% παγκοσμίως. Ο ελληνικός κλάδος υδατοκαλλιέργειας προσανατολίζεται σε μεγάλο βαθμό στις

εξαγωγές, καθώς περίπου το 80% της παραγωγής εξάγεται, ενώ το υπόλοιπο 20% πωλείται στην εγχώρια αγορά (FGM 2016).



**Σχήμα 1.2.1.:** Χώρες εξαγωγής της ελληνικής παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού (FGM 2016).



**Σχήμα 1.2.2.:** Παγκόσμια παραγωγή τσιπούρας υδατοκαλλιέργειας έως το 2014 (FAO 2017).

### **1.3. Διατροφική αξία ιχθύων**

Τα ψάρια αποτελούν πηγή πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, ω-3 και ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και βιταμινών D και B2 (ριβοφλαβίνη). Η πρωτεΐνη των μυών των ψαριών είναι πλούσια σε απαραίτητα αμινοξέα και μπορεί να πεφθεί εύκολα, εξαιτίας του χαμηλού περιεχομένου σε συνδετικό ιστό (Boziaris 2014). Είναι πλούσια σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία, όπως σε ασβέστιο και φώσφορο, σίδηρο, ψευδάργυρο, μαγνήσιο και κάλιο, ενώ το σελήνιο και το ιώδιο είναι τα δύο πιο σημαντικά στοιχεία στα ψάρια αλμυρού νερού (Oehlenschläge 2010a, 2010b) και τα ψάρια αποτελούν τη μόνη φυσική πηγή αυτών. Όλα τα παραπάνω αποτελούν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που προάγουν την ανθρώπινη υγεία.

### **1.4. Φρεσκότητα και διάρκεια ζωής τροφίμων**

Για τον όρο 'φρεσκότητα' των ψαριών δεν έχει δοθεί συγκεκριμένος ορισμός, όμως σύμφωνα με τους Oehlenschläge και Sorensen (1997) με τον όρο φρεσκότητα νοείται ότι όλες οι ιδιότητες ενός ψαριού δεν απέχουν πολύ από τις ιδιότητες που είχε όταν ήταν ζωντανό ή ότι έχει περάσει μόνο ένα μικρό χρονικό διάστημα από την αλίευσή του.

Ο ορισμός της διάρκειας ζωής των τροφίμων είναι ουσιαστικά αδύνατο να καθοριστεί, δεδομένου ότι είναι αδύνατον να ικανοποιεί όλους τους καταναλωτές ανά πάσα στιγμή (Bin & Theodore 1993). Ο Matis (2012) ορίζει τη διάρκεια ζωής ως τη χρονική στιγμή, κατά την οποία ένα προϊόν διατροφής είναι κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση. Σύμφωνα με τους Kilcast και Subramaniam (2000) η διάρκεια ζωής ενός προϊόντος ορίζεται ως ο χρόνος κατά τον οποίο το προϊόν θα παραμείνει ασφαλές και θα διατηρήσει τα οργανοληπτικά, χημικά, φυσικά και μικροβιολογικά του χαρακτηριστικά και θα συμμορφώνεται με οποιαδήποτε διατροφικά δεδομένα αναγράφονται στην ετικέτα του. Το Ινστιτούτο της Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Λονδίνου (Institute of Food Science and Technology: London 1993), αναφέρει ότι η διάρκεια ζωής ενός προϊόντος διατροφής καθορίζεται με βάση τον χρόνο κατά τον οποίο το προϊόν διατροφής, αποθηκευμένο υπό τις συνιστώμενες

συνθήκες, θα παραμείνει ασφαλές και θα διατηρήσει τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η διάρκεια ζωής των τροφίμων είναι συνάρτηση της σύστασης τους, της επεξεργασίας που θα υποστεί, της συσκευασίας στην οποία θα τοποθετηθεί και των περιβαλλοντικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της υγρασίας και της θερμοκρασίας (Bili & Taoukis 2007).

### **1.5. Αλλοίωση ιχθύων**

Ως αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να θεωρηθεί οποιαδήποτε αλλαγή, που καθιστά ένα προϊόν μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση (Hayes 1985). Τα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών αποτελούν μία από τις σημαντικότερες πηγές πρωτεϊνών στη διατροφή του ανθρώπου, όμως είναι ιδιαίτερα ευπαθή στην αλλοίωση, διότι η αλλοίωση είναι πιο γρήγορη και εμφανής στις πρωτεϊνούχες τροφές όπως τα ψάρια. Η αλλοίωση επέρχεται ως συνέπεια τριών διαφορετικών μηχανισμών: α) της μικροβιακής δραστηριότητας, β) της χημικής οξειδωσης των λιπιδίων και γ) της αυτόλυσης (Gram & Huss 1996). Ωστόσο, η μικροβιακή δραστηριότητα είναι μακράν ο σημαντικότερος μηχανισμός που επηρεάζει την ποιότητα των νωπών ψαριών (Parlapani et al. 2013). Το κατά πόσο θα συμβάλλει ο κάθε μηχανισμός στην συνολική αλλοίωση εξαρτάται από το είδος του αλιεύματος (π.χ. άπαχο ή λιπαρό ψάρι, καρκινοειδές κτλ), τον τύπο του προϊόντος (νωπό, επεξεργασμένο, κτλ) και τις συνθήκες αποθήκευσης (αερόβια ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα, κενό κτλ). Το ένα τέταρτο της προσφοράς τροφίμων παγκοσμίως (Huis in't Veld 1996) και το 30% των αλιευμένων ψαριών (Amos 2007) χάνονται ως αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας, ενώ οι χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα και η μικροβιακή αλλοίωση ευθύνονται για την απώλεια του 25% των αλιευτικών προϊόντων κάθε χρόνο (Baird-Parker 2000).

Η αλλοίωση των ψαριών επέρχεται πολύ γρήγορα, αμέσως μετά τη σύλληψή τους και μπορεί να εκδηλωθεί με αλλαγές στην οσμή, τη γεύση, το άρωμα, την υφή και την εμφάνιση του ψαριού, με τον σχηματισμό «γλίτσας», την αλλαγή του χρωματισμού, την ορατή ανάπτυξη μικροοργανισμών και την παραγωγή δυσάρεστης οσμής και γεύσης. Κατά την αλλοίωση των ψαριών, λαμβάνει χώρα καταστροφή διαφόρων συστατικών (πρωτεΐνες και λιπίδια) και σχηματισμός νέων ενώσεων. Αυτές οι νέες ενώσεις ευθύνονται για τις μεταβολές στην οσμή, στη γεύση και στην υφή της



σάρκας των ψαριών (Ghaly et al. 2010). Οι μεταβολές αυτές κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης των ιχθύων έχουν ως αποτέλεσμα την οξείδωση των λιπιδίων, την αποδόμηση των πρωτεϊνών καθώς και την απώλεια άλλων πολύτιμων μορίων (Ghaly et al. 2010).

Με τη συνεχή αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού αλλά και την ανάγκη αποθήκευσης και μεταφοράς των τροφίμων από το ένα μέρος στο άλλο, η συντήρηση των τροφίμων καθίσταται αναγκαία όπως και η αύξηση της διάρκειας ζωής τους σε συνδυασμό με τη διατήρηση της διατροφικής τους αξίας, υφής, εμφάνισης, αρώματος και γεύσης. Οι τεχνικές συντήρησης των τροφίμων όμως πρέπει να αποτρέπουν την μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων χωρίς να επηρεάζουν την ποιότητα και τη θρεπτική τους αξία (Ghaly et al. 2010).

### **1.5.1. Μηχανισμοί αλλοίωσης ιχθύων**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η αλλοίωση των ψαριών είναι αποτέλεσμα τριών βασικών μηχανισμών και πιο συγκεκριμένα της χημικής οξείδωσης, της αυτόλυσης και της μικροβιακής δραστηριότητας.

#### **1.5.1.1. Αυτόλυση**

Λίγο μετά τη αλίευση των ιχθύων, οι χημικές και βιολογικές μεταβολές λαμβάνουν χώρα λόγω της διάσπασης των κυρίων μορίων των ιχθύων από ένζυμα (FAO 2005). Η αρχική απώλεια της ποιότητας οφείλεται κυρίως στις αλλαγές που προκαλούνται εξαιτίας της αυτόλυσης, όπως η αποδόμηση των νουκλεοτιδίων (ενώσεις που σχετίζονται με το ATP) από αυτολυτικά ένζυμα. Μια από τις σημαντικότερες αυτολυτικές διεργασίες αποτελεί η διάσπαση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) αλλά και άλλων ενώσεων από τη δράση διάφορων ενζύμων.

Τα πεπτικά ένζυμα προκαλούν εκτεταμένη αλλοίωση με αποτέλεσμα το μαλάκωμα της σάρκας (FAO 1986). Στους μυς και στα σπλάχνα των ψαριών βρίσκεται ένας αριθμός πρωτεολυτικών ενζύμων (καθεψίνες, κολλαγονάσες), έπειτα από την

αλίευση τους, τα οποία συμβάλλουν στην αποδόμηση των μυών των ψαριών και στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, που προάγουν την μικροβιακή ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της επεξεργασίας (Huss, 1995). Σύμφωνα με τους Fraser & Sumar (1998) μπορούν να παραχθούν πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα εξαιτίας της αυτόλυσης των πρωτεϊνών των μυών των ψαριών που οδηγούν στην αλλοίωση της σάρκας τους, ως αποτέλεσμα της μικροβιακής ανάπτυξης και της παραγωγής βιογενών αμινών (Fraser & Sumar 1998).

Οι Hansen et al. (1996) ανέφεραν ότι τα αυτολυτικά ένζυμα προκάλεσαν υποβάθμιση στην υφή των ιχθύων κατά τα αρχικά στάδια της αλλοίωσης αλλά δεν προκάλεσαν χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στην οσμή και το άρωμα. Αυτό υποδεικνύει ότι η αυτόλυση μπορεί να περιορίσει τη διάρκεια ζωής και την ποιότητα του προϊόντος ακόμη και με σχετικά χαμηλά επίπεδα αλλοιωγόνων οργανισμών.

#### **1.5.1.2. Χημική οξείδωση**

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μια σημαντική αιτία υποβάθμισης και αλλοίωσης των πελαγικών ειδών ψαριών, με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες (Fraser & Sumar 1998). Η οξείδωση των λιπιδίων μπορεί να γίνει είτε ενζυμικά, είτε μη ενζυμικά. Η ενζυμική υδρόλυση των λιπών από τη δράση λιπασών ονομάζεται λιπόλυση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, οι λιπάσες διασπούν τα γλυκερίδια σχηματίζοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα τα οποία είναι υπεύθυνα για: (α) την υποβάθμιση της γεύσης (τάγγισμα) και (β) την υποβάθμιση της ποιότητας των λιπιδίων (Huis in't Veld 1996, FAO 1986). Τα λιπολυτικά ένζυμα θα μπορούσαν είτε να προέρχονται από το ίδιο το τρόφιμο είτε να προέρχονται από τη δράση ψυχρότροφων μικροοργανισμών (Huis in't Veld, 1996). Τα εμπλεκόμενα ένζυμα είναι οι λιπάσες που υπάρχουν στο δέρμα, στο αίμα και στον ιστό των ιχθύων. Τα κύρια ένζυμα που συμβάλλουν στην υδρόλυση των λιπιδίων των ψαριών είναι η τριακυλ-λιπάση και η φωσφολιπάση A2 και B (Audley et al. 1978, Yorkowski & Brockerhoff 1965). Η μη ενζυμική οξείδωση προκαλείται από ενώσεις αιματίνης (αιμογλοβίνη, μυογλοβίνη, κυτόχρωμα) που παράγουν υδροϋπεροξειδία (Fraser & Sumar 1998). Τα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται κατά την διάρκεια της υδρόλυσης των λιπιδίων των ψαριών αλληλεπιδρούν με τις

σαρκοπλασματικές και μυοϊνιδιακές πρωτεΐνες προκαλώντας μετουσίωση (Anderson & Ravesi 1969, King et al. 1962).

### 1.5.1.3. Μικροβιακή δραστηριότητα

Τα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών έχουν υψηλή θρεπτικότητα, διαθέτουν ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο pH και υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Επομένως επιτρέπουν την ανάπτυξη ευρέος φάσματος μικροοργανισμών (Huis in't Veld 1996). Η αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να λάβει ποικίλες μορφές, αλλά όλες αυτές είναι συνέπεια της μικροβιακής ανάπτυξης ή/και δραστηριότητας που εκδηλώνεται με μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Gram & Huss 1996).

Η μικροχλωρίδα των ψαριών περιλαμβάνει είδη βακτηρίων όπως *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Micrococcus* κ.α. (Gram & Huss 2000). Η μικροβιακή ανάπτυξη και ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών αποτελούν κύρια αιτία της αλλοίωσης των ψαριών καθώς προκαλούν την παραγωγή αμινών, βιογενών αμινών (π.χ. πουτρεσκίνη, ισταμίνη και καδαβερίνη), τριμεθυλαμίνης (TMA), σουλφιδίων, αλκοολών, αλδεϋδων και κετόνων με αποτέλεσμα την παραγωγή δυσάρεστης οσμής (Ghaly et al. 2010).

Η σύνθεση της μικροχλωρίδας στα αλιευμένα ψάρια εξαρτάται από το μικροβιακό φορτίο και περιεχόμενο του νερού στο οποίο ζουν τα ψάρια, με αποτέλεσμα τα ακατέργαστα τρόφιμα να έχουν αρχικά μολυνθεί με μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, αλλά μόνο μερικοί από αυτούς είναι σε θέση να αποικίσουν τα τρόφιμα και να αναπτυχθούν σε μεγάλους αριθμούς. Οι αλλαγές που αφορούν την επεξεργασία και τη συσκευασία των προϊόντων αλιείας προκαλούν μια σημαντική αλλαγή στη σύνθεση και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση και ένα εντελώς διαφορετικό είδος αλλοίωσης. Ωστόσο, ακόμη και για τον ίδιο τύπο προϊόντος, η αλλοίωση μπορεί να εξελιχθεί διαφορετικά, ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση και άλλους παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την ανάπτυξη μικροβίων (Gram & Huss 1996).

Έτσι η μικροβιακή χλωρίδα που αποικίζει ένα συγκεκριμένο τρόφιμο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα χαρακτηριστικά του προϊόντος και τον τρόπο με τον οποίο μεταποιείται και αποθηκεύεται. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό

των μικροοργανισμών στα τρόφιμα αλλά και τα είδη των μικροοργανισμών που τελικά θα επικρατήσουν σε αυτά μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις ομάδες: (α) ενδογενείς παράγοντες, (β) εξωγενείς παράγοντες (γ) τρόπος επεξεργασίας και συντήρησης και (δ) από απροσδιόριστους και μικροβιακούς παράγοντες (Mossel et al. 1995).

(α) Οι ενδογενείς παράγοντες αφορούν τις φυσικές, χημικές και δομικές ιδιότητες του τροφίμου. Οι σημαντικότεροι είναι η ενεργότητα του νερού, η οξύτητα, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά και οι φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες που περιέχει. Όλα τα παραπάνω καθορίζονται από τη ποιοκίλοθερμη φύση του ψαριού και το υδατικό περιβάλλον που διαβιεί, το υψηλό pH της σάρκας (συνήθως >6) μετά τη θανάτωσή του, τη παρουσία μεγάλων ποσοτήτων μη πρωτεϊνικού αζώτου και την παρουσία οξειδίου τριμεθυλαμίνης (TMAO).

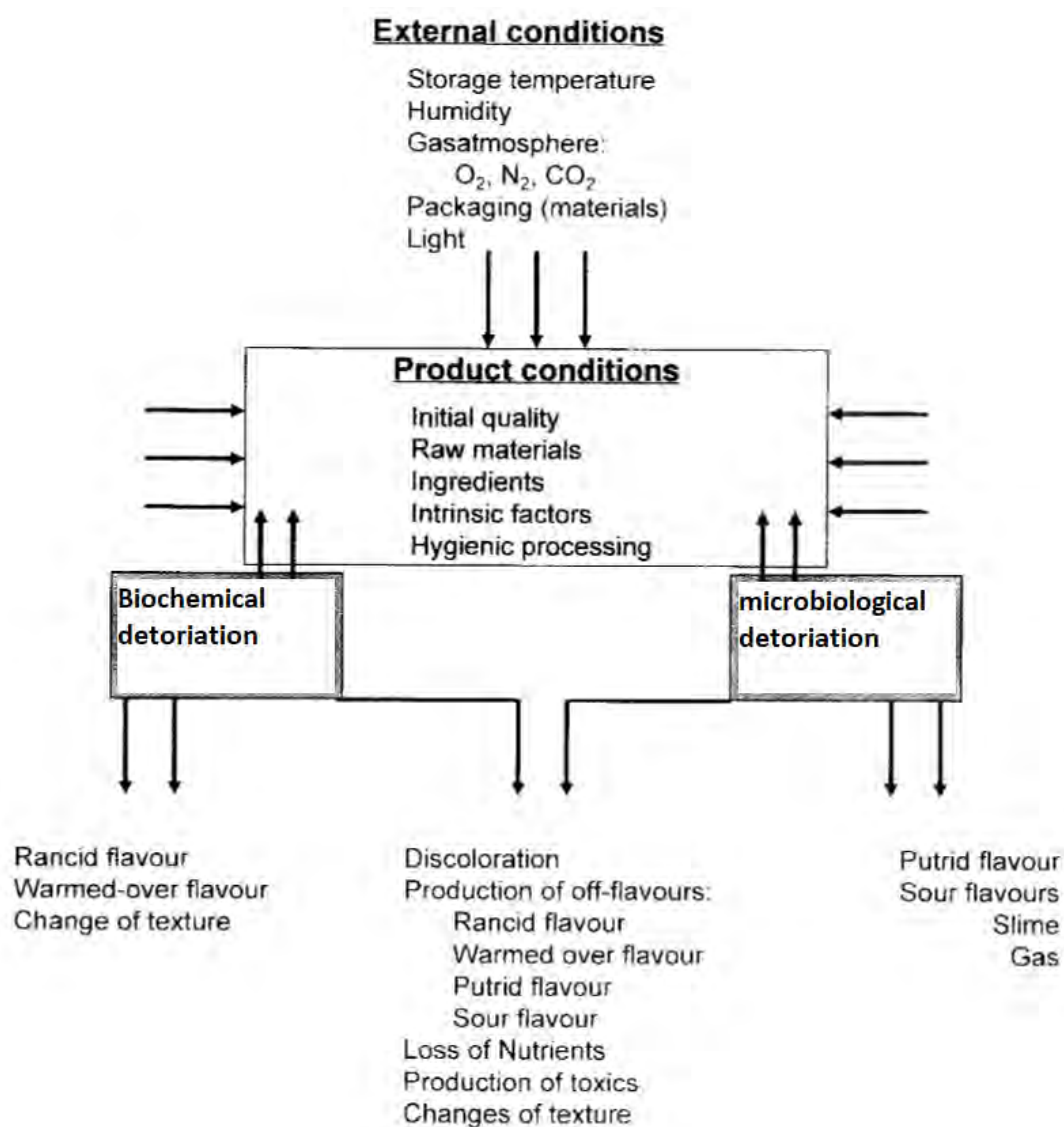
(β) Οι εξωγενείς παράγοντες αφορούν το περιβάλλον στο οποίο αποθηκεύεται ένα τρόφιμο, δηλαδή η θερμοκρασία, η υγρασία και η σύνθεση της ατμόσφαιρας που έχει αποθηκευτεί.

(γ) Οι φυσικές ή χημικές μέθοδοι επεξεργασίας συχνά οδηγούν σε αλλαγές στα χαρακτηριστικά ενός προϊόντος διατροφής, προσδιορίζοντας τη μικροχλωρίδα που σχετίζεται με το προϊόν.

(δ) Άλλοι παράγοντες είναι οι αμοιβαίες επιρροές, συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές, μεταξύ των μικροοργανισμών. Είναι δηλαδή το αποτέλεσμα της ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού ο οποίος μπορεί να έχει συνεργιστική ή ανταγωνιστική επίδραση επί της μικροβιακής δραστηριότητας άλλων μικροοργανισμών που υπάρχουν στο προϊόν διατροφής (Mossel et al., 1995). Οι συνεργιστικές επιδράσεις περιλαμβάνουν την παραγωγή ή τη διαθεσιμότητα βασικών θρεπτικών ουσιών, λόγω της ανάπτυξης μιας συγκεκριμένης ομάδας μικροοργανισμών, που επιτρέπουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών που διαφορετικά δεν θα μπορούσαν να αναπτυχθούν. Παρομοίως, οι μεταβολές της τιμής του pH, του δυναμικού οξειδοαναγωγής και της ενεργότητας του νερού μπορούν να επιτρέψουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών λιγότερο ανεκτικών σε αυτούς τους ανασταλτικούς παράγοντες, αποδίδοντας δευτερεύουσα αλλοίωση. Οι ανταγωνιστικές διεργασίες περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό για τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, τις μεταβολές της τιμής του pH ή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού ή τον σχηματισμό αντιμικροβιακών ουσιών, που μπορεί να επηρεάσουν

αρνητικά την επιβίωση ή την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών (Stiles & Hastings 1991, Kim 1993, Huis in 't Veld et al. 1996, Abee et al. 1996).

Ένα άλλο σημαντικό φαινόμενο, το οποίο αξίζει προσοχής στη συντήρηση των τροφίμων είναι η ομοιόσταση των μικροοργανισμών (Gould 1988). Εάν η ομοιόσταση ενός είδους μικροοργανισμών διαταράσσεται από τις συνθήκες διατήρησης που βρίσκεται το τρόφιμο, αυτοί δεν θα πολλαπλασιαστούν, δηλαδή θα παραμείνουν στη στάσιμη φάση ή ακόμη και θα πεθάνουν, πριν αποκατασταθεί η ομοιόστασή τους.



**Εικόνα 1.5.1.3.1.:** Υποβάθμιση της ποιότητας κατά την αποθήκευση των τροφίμων. Προσαρμογή από τον Huis in't Veld (1996).

#### 1.5.1.3.1. Μικροβιακή σύνθεση ιχθύων αποθηκευμένων σε χαμηλές θερμοκρασίες

Η αρχική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών που προέρχονται από εύκρατα ύδατα συνήθως αποτελείται από διάφορα ψυχρότροφα Gram-αρνητικά βακτηρίδια όπως τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Shewanella* και *Vibrionaceae* (Gram & Dalgaard 2002, Leisner & Gram 1999). Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την μικροβιακή αλλοίωση των ψαριών που αποθηκεύονται σε ψύξη, που αλιεύθηκαν από τη Μεσόγειο Θάλασσα, χρησιμοποιώντας τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές και διαπίστωσαν ότι τα *Pseudomonas spp.* και *Shewanella spp.* είναι οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί αλλοίωσης (Tryfinopoulou et al. 2002, Tryfinopoulou et al. 2007, Gennari et al. 1999). Διαπιστώθηκε ότι η αλλοίωση των ψαριών, που προέρχονται από εύκρατα ύδατα και αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, προκαλείται από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και από υδροθειούχα ( $H_2S$ ) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένων των *Shewanella spp.*), έπειτα από τη χρήση μικροβιολογικών τεχνικών (Gram & Huss 1996).

Με τη χρήση μοριακών τεχνικών διαπιστώθηκε ότι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Shewanella* και *Macrococcus* αντιπροσωπεύουν την αρχική μικροχλωρίδα της τσιπούρας (Parlapani et al., 2013, 2015a). Επίσης, έπειτα από τη χρήση μοριακών τεχνικών βρέθηκε ότι κυρίως τα *Pseudomonas spp.* και δευτερευόντως τα βακτήρια *Shewanella spp.* αποτελούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς αλλοίωσης της τσιπούρας, τόσο ολόκληρης όσο και σε φιλέτα, που διατηρήθηκε σε χαμηλές θερμοκρασίες υπό αερόβιες συνθήκες (Parlapani et al. 2013, 2015a, Parlapani & Boziaris 2016).

Τα βακτήρια *Pseudomonas spp.* αποτελούν τον πιο κοινό μικροοργανισμό αλλοίωσης, ιδιαίτερα υπό αερόβιες συνθήκες αποθήκευσης (Gill, 1996, Huis in't Veld, 1996). Τα αρνητικά κατά gram βακτηρίδια που παράγουν  $H_2S$  συσχετίζονται συνήθως με την αλλοίωση των τροφίμων (Herbert et al. 1971) και συνιστούν συνήθως ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροχλωρίδας στα ψάρια, αλλά αποτελούν σημαντικό, μερικές φορές κυρίαρχο, τμήμα της μικροχλωρίδας κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ψύξη (Gram & Vogel 2000, Jorgensen et al. 1988) και οι αριθμοί τους καθορίζουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Jorgensen et al. 1988). Όλα τα είδη *Shewanella* διασπούν

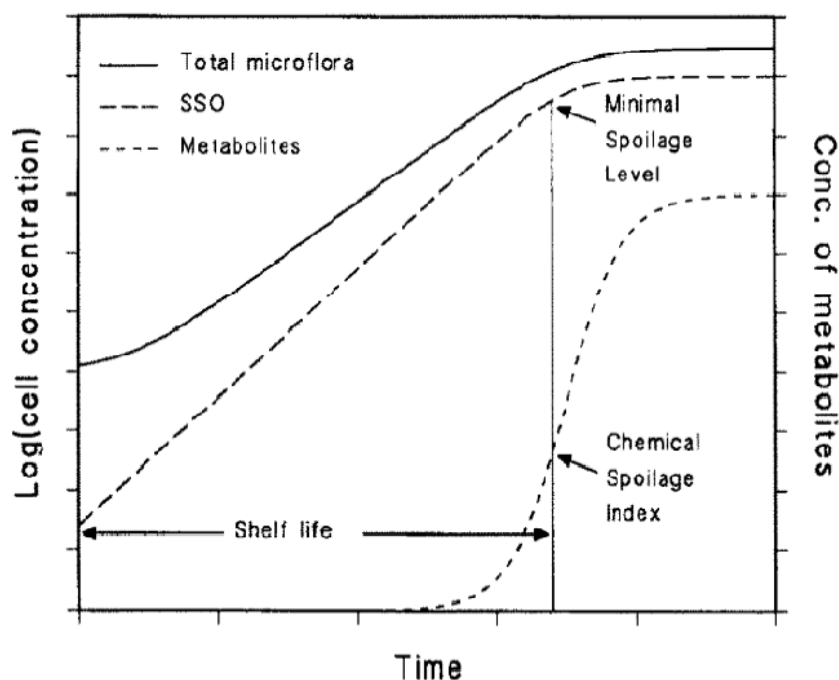
το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO), παράγουν  $H_2S$  και αναπτύσσονται καλά σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Vogel et al. 2005).

Τα ελαφρώς συντηρημένα προϊόντα ψαριών μπορεί επίσης να περιέχουν χαμηλά ( $10\text{ cfu/g}$ ) ή υψηλά ( $10^6\text{--}10^7\text{ cfu/g}$ ) επίπεδα βακτηρίων του γένους *Enterobacteriaceae* και *Brochothrix thermosphacta* (Cann et al. 1984, Civera et al. 1984, Cory 1995, Leisner et al. 1994, Truelstrup Hansen et al. 1996). Με αυξανόμενη τη θερμοκρασία, τα *Enterobacteriaceae* καθίστανται επίσης συν-κυρίαρχα με τις ψευδομονάδες ή/και τα βακτήρια που παράγουν  $H_2S$  (Gram et al. 1987, Gram & Huss 1996). Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ( $25^\circ\text{C}$ ), η μικροχλωρίδα κυριαρχείται από τα *Enterobacteriaceae* εάν τα ψάρια αλιεύονται από μολυσμένα νερά (Gram 1992). Τα *Enterobacteriaceae* προκαλούν αλλοίωση μέσω της παραγωγής ανεπιθύμητων οσμών και της ικανότητά τους να παράγουν  $H_2S$  από πρωτεϊνικά υποστρώματα (Truelstrup Hansen 1995). Οι μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta* μπορεί να είναι περιστασιακά παρόντες σε νωπά κρέατα (Gardner 1981) και βρέθηκαν επίσης να αποτελούν μέλος του τελικού μικροβιακού τους πληθυσμού (Koutsoumanis & Nychas 1999).

#### **1.5.1.3.2. Ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (SSOs)**

Η μικροβιακή αλλοίωση είναι η κύρια αιτία της υποβάθμισης της ποιότητας των νωπών θαλασσινών. Τα ακατέργαστα τρόφιμα αρχικά έχουν μολυνθεί από μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, αλλά μόνο ένα μέρος από αυτούς είναι σε θέση να αποικίσει τα τρόφιμα και να αναπτυχθεί σε μεγάλους αριθμούς (Gram & Huss 1996). Έτσι η αλλοίωση προκαλείται από ένα κλάσμα του συνόλου της αρχικής μικροχλωρίδας, που καλούνται "Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (SSOs)" (Gram & Dalgaard 2002). Οι ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (SSOs) είναι παρόντες σε μικρές ποσότητες και αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας και κάτω υπό συγκεκριμένες συνθήκες αποθήκευσης (π.χ. ατμόσφαιρα, θερμοκρασία) αναπτύσσονται ταχύτερα από την υπόλοιπη μικροχλωρίδα και παράγουν μεταβολίτες (χημικοί δείκτες αλλοίωσης), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή δυσάρεστης οσμής και γεύσης, με αποτέλεσμα τελικά να οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Dalgaard 2003, Gram & Huss 1996).

Η συγκέντρωση των κυττάρων των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (SSOs), όσον αφορά την απόρριψη του προϊόντος, μπορεί να οριστεί ως το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης και η συγκέντρωση του μεταβολίτη που αντιπροσωπεύει την αλλοίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντικειμενικός χημικός δείκτης μικροβιακής αλλοίωσης (Dalgaard 1993).



**Σχήμα1.5.1.3.1.1.:** Γενικό πρότυπο μικροβιακής αλλοίωσης. SSO: ειδικοί οργανισμοί αλλοίωσης, MSL: ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, CSI: χημικός δείκτης αλλοίωσης. Προσαρμογή από τον Dalgaard 1993.

## 1.6. Μέθοδοι συντήρησης ιχθύων

Τα ψάρια αποτελούν μια εξαιρετική πηγή λευκού κρέατος και έχουν γίνει ευρέως αποδεκτά από τους καταναλωτές λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και της χαμηλής τους περιεκτικότητας σε λιπαρά, ιδιαίτερα σε χοληστερόλη (Chun-hua et al. 2014). Με τον αυξανόμενο παγκόσμιο πληθυσμό και την ανάγκη να παρέχονται στους καταναλωτές φρέσκα και υγιεινά τρόφιμα, η συντήρηση των



τροφίμων άρχισε να γίνεται ολοένα και περισσότερο αναγκαία με στόχο να αυξηθεί η διάρκεια ζωής και να διατηρηθεί η θρεπτική αξία, η υφή, η γεύση και το άρωμα των τροφίμων (Kaale et al. 2011). Οι καταναλωτές απαιτούν δηλαδή πολύ καλή ποιότητα, θρεπτικότητα, ασφάλεια και φρεσκότητα των ψαριών που καταναλώνουν (Chun-hua et al. 2014) και κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ορισμένων μεθόδων συντήρησης, όπως με ψύξη, κατάψυξη, τη μέθοδο super chilling (στα ελληνικά αναφέρεται ως υπέρψυξη), ξήρανση, αλάτισμα και συμπύκνωση, συσκευασία σε κενό και τροποποιημένη ατμόσφαιρα απουσία οξυγόνου, συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα πλούσια σε CO<sub>2</sub>, προσθήκη οργανικών οξέων, γαλακτική ζύμωση, προσθήκη συντηρητικών, παστερίωση και αποστείρωση, ακτινοβολήση και εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης. Οι πιο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι περιλαμβάνουν την αποθήκευση σε ψύξη σε θερμοκρασία μεταξύ 0 °C – 4 °C, αποθήκευση σε συνθήκες υπέρψυξης (superchilling) σε θερμοκρασία από (-1) °C - (-4) °C και σε κατάψυξη σε θερμοκρασία κυμαινόμενη από (-18) °C - (-40) °C (Gallart-Jornet et al. 2007).

### **1.6.1. Ψύξη**

Η συντήρηση των τροφίμων υπό ψύξη περιλαμβάνει την αποθήκευση αυτών σε θερμοκρασία από 0 °C έως 4 °C (Gallart-Jornet et al. 2007). Η συντήρηση ιχθύων υπό ψύξη συμβάλλει στη διατήρηση της φρεσκότητας τους αλλά δεν έχει τη δυνατότητα να θανατώσει ή να εξαλείψει τους μικροοργανισμούς ούτε να σταματήσει την ενζυμική δραστηριότητα (Sampels 2015). Οι περισσότερες βιοχημικές διεργασίες αλλοίωσης επιβραδύνονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία (Ashie et al. 1996). Πιο συγκεκριμένα, αυτή η μέθοδος συντήρησης δεν θανατώνει τους μικροοργανισμούς, αλλά μειώνει τον μικροβιακό μεταβολισμό που είναι υπεύθυνος για την αλλοίωση (Ashie et al. 1996), με αύξηση της φάσης προσαρμογής και μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Οι Johnston et al. (1994) ανέφεραν ότι η αποθήκευση υπό ψύξη είναι αποτελεσματική μέθοδος συντήρησης των ψαριών αλλά δεν βελτιώνει την ποιότητα του προϊόντος.

### 1.6.2. Υπέρψυξη (superchilling)

Η υπέρψυξη περιλαμβάνει την αποθήκευση των προϊόντων σε θερμοκρασία κοντά ή ακριβώς κάτω από το αρχικό σημείο ψύξης, το οποίο είναι για τα περισσότερα τρόφιμα μεταξύ  $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $-2,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Kaale et al. 2011, Duun & Rustad 2007). Συνεπάγεται δηλαδή θερμοκρασίες στο όριο μεταξύ ψύξης και κατάψυξης. Σύμφωνα με τους Duun και Rustad (2007) είναι μια διαδικασία με την οποία η θερμοκρασία ενός προϊόντος διατροφής μειώνεται σε 1-2 βαθμούς Κελσίου κάτω από το αρχικό σημείο ψύξης του προϊόντος. Οι Ando et al. (2004) όρισαν την υπέρψυξη ως τη ζώνη θερμοκρασίας κάτω από  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , αλλά σε θερμοκρασία όπου δεν πραγματοποιείται σχηματισμός παγοκρυστάλλων και οι Beaufort et al. (2009) την όρισαν ως μια τεχνολογία όπου τα τρόφιμα αποθηκεύονται ακριβώς κάτω από την αρχική θερμοκρασία ψύξης.

Σε θερμοκρασίες υπέρψυξης, η μικροβιακή δραστηριότητα ελαττώνεται και τα περισσότερα βακτήρια αδυνατούν να αναπτυχθούν (Kaale et al. 2011). Η υπέρψυξη μπορεί να αναστείλει τις περισσότερες αυτολυτικές και μικροβιακές δραστηριότητες σε σύγκριση με την ψύξη (Huss 1995). Εκτός από το γεγονός ότι αυτή η τεχνική διατηρεί την ποιότητα των φρέσκων ψαριών και αυξάνει τον εμπορικό χρόνο ζωής τους, αποτρέπει ταυτόχρονα την απώλεια υγρών που λαμβάνει χώρα κατά την απόψυξη των ψαριών (Fukuma et al. 2012). Ωστόσο, θα μπορούσε να ενισχύσει την αποδόμηση των πρωτεϊνών και την οξείδωση των λιπιδίων λόγω της σταδιακής ψύξης και μερικής κατάψυξης (Sampels 2015). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών στο ελεύθερο νερό που υπάρχει στα ψάρια που δεν έχει ακόμη παγώσει, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα, μετουσίωση των μυϊκών πρωτεϊνών και δομική βλάβη των μεμβρανών (Duun & Rustad 2007, 2008). Έχει αναφερθεί ότι τα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών θα μπορούσαν να αντιδρούν με stress σε χαμηλές θερμοκρασίες, δηλαδή σε θερμοκρασίες κάτω από  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στην απελευθέρωση ελεύθερων αμινοξέων και σακχάρων στα κύτταρα για να αντισταθεί στην κατάψυξη (Ando et al. 2004). Θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες των ψαριών. Επιπλέον, καθώς τα ελεύθερα αμινοξέα είναι πιο επιρρεπή σε οξείδωση και ενζυμική διάσπαση, αυτό θα μειώσει στη συνέχεια τη σταθερότητα της αποθήκευσης.

### **1.6.3. Κατάψυξη**

Η συντήρηση των τροφίμων σε κατάψυξη πραγματοποιείται σε περιβάλλον με θερμοκρασίες από -18 °C έως -40 °C (Gallart-Jornet et al. 2007). Η αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης είναι μια μέθοδος που θεωρείται αποτελεσματική για τη διατήρηση του κρέατος για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους (Jeremiah 1980). Η κατάψυξη ελαχιστοποιεί τη μικροβιακή και ενζυμική δραστηριότητα και διατηρεί την γεύση και τις θρεπτικές ιδιότητες του προϊόντος καλύτερα από την αποθήκευση με απλή ψύξη (Alizadeh et al. 2007). Ωστόσο, ο σχηματισμός παγοκρυστάλλων κατά τη διάρκεια της κατάψυξης είναι ένα κρίσιμο σημείο (Rahelic et al. 1985) που μπορεί να προκαλέσει υποβάθμιση της υφής και αυξημένη οξείδωση (Alizadeh et al. 2007).

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. Γενικός πειραματικός σχεδιασμός**

Σαράντα οχτώ (48) φιλέτα ιχθύων τσιπούρας βάρους περίπου 400g της εταιρίας SELONDA, μεταφέρθηκαν στον χώρο του εργαστηρίου Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Πραγματοποιήθηκαν δύο παραλαβές φιλέτων, δηλαδή είκοσι τέσσερα (24) φιλέτα σε κάθε μία. Η πρώτη παρτίδα ελήφθη στις 25/11/2015, ενώ η δεύτερη στις 9/04/2016. Κατά την μεταφορά τους ήταν αποθηκευμένα σε πλαστικές σακούλες οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε ισοθερμικά κιβώτια με πάγο. Τα ψάρια είχαν αλιευθεί και φιλετοποιηθεί 24h πριν φθάσουν στο χώρο του εργαστηρίου. Αμέσως μετά την παραλαβή τους τα ψάρια αποθηκεύτηκαν κάτω υπό αερόβιες συνθήκες στους 2 °C και στους -1,5 °C, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε και η πρώτη μέτρηση του πειράματος.

Στο πείραμα έλαβε χώρα μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων με σκοπό την παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών καθώς και οργανοληπτική αξιολόγηση αυτών όσον αφορά την εμφάνιση, την γεύση και την οσμή, με στόχο τον προσδιορισμό του εμπορικού χρόνου ζωής των προϊόντων αλλά και τη συσχέτισή τους με τις μικροβιακές μεταβολές κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

Οι μετρήσεις λαμβάνονταν για τα φιλέτα τσιπούρας που ήταν αποθηκευμένα στους 2 °C κάθε τρεις (3) ημέρες ενώ για τα φιλέτα τσιπούρας που ήταν αποθηκευμένα στους -1,5 °C κάθε πέντε (5) ημέρες.

## 2.2. Μικροβιολογική ανάλυση

### 2.2.1. Μικροβιολογικά υλικά

Τα μικροβιολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK), εκτός ενός, του STAA (Streptomycin Sulphate-Thallus Acetate-Cycloheximide Actidione Agar) το οποίο προέρχονταν από την Biolife Italiana srl (Milano, Italy).

#### 2.2.1.1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

Το TSA (LAB011) (Trypton Soy Agar) αποτελεί ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης και επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια αερόβιων αλλά και αναερόβιων βακτηρίων. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας έχουν την ιδιότητα να παρέχουν άζωτο (N), βιταμίνες και μέταλλα, ενώ τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) λειτουργεί ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Το υλικό αυτό παρασκευάζεται με την χρήση των υλικών που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 1).

**Πίνακας 1:** Συστατικά του υλικού TSA (Trypton Soy Agar) σε g/1000 ml.

Trypton	15,0
Soy pepton	5,0
Sodium Chloride	5,0
Agar	12,0

#### Διαδικασία παρασκευής:

Ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν 37 g θρεπτικού υλικού TSA σε μια φιάλη και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένο νερό. Έπειτα πραγματοποιήθηκε αποστείρωση αυτού στο αυτόκαυστο, στην θερμοκρασία των 121 °C για 15 min και

στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Αφέθηκε σε κατάσταση ηρεμίας ώσπου να στερεοποιηθεί πλήρως στα τρυβλία και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 5-10 °C για μελλοντική χρήση.

### 2.2.1.2. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Το θρεπτικό μέσο CFC (Cetrimide Fucidin Chephaloridine), (LAB108) περιέχει όλα εκείνα τα συστατικά (π.χ. αμινοξέα, βιταμίνες, κτλ) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του συγκεκριμένου είδους, ενώ η προσθήκη αντιβιοτικού μετατρέπει το θρεπτικό υλικό σε εκλεκτικό για τα *Pseudomonas* spp. Η πεπτόνη ζελατίνης και η καζεΐνη από ενζυματική πέψη παρέχουν άζωτο, θείο και τις βιταμίνες που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί αυτοί για να αναπτυχθούν. Το χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl<sub>2</sub>) και τοθειϊκό κάλιο (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) παράγουν χρωστική ουσία. Η γλυκερόλη προστίθεται ως πηγή άνθρακα (C). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες Sodium Nalidixate, Fucidin και Cephaloridine είναι εκλεκτικά υλικά και χρησιμοποιούνται για να αναστείλουν την ανάπτυξη των Gram<sup>+</sup> και ορισμένων Gram<sup>-</sup> βακτηρίων. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του απεικονίζονται στους παρακάτω πίνακες (Πιν.2, Πιν. 3).

**Πίνακας 2:** Συστατικά του υλικού CFC (Cetrimide Fucidin Chephaloridine) σε g/1000 ml.

Gelatin Peptone	16,0
Potassium Sulphate	10,0
Enzymatic Digest of Casein	10,0
Magnesium Chloride	1,4
Bacteriological Agar	13,0

**Πίνακας 3:** Συστατικά του εκλεκτικού μέσου CFC (κάθε φιαλίδιο περιέχει ποσότητα mg/500 ml θρεπτικού).

Cetrimide	5,0
Fucidin	5,0
Cephaloridine	25,0

### Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν 25,2 g θρεπτικού υλικού CFC και προστέθηκαν 500 ml απιονισμένο νερό και έπειτα 5 ml γλυκερόλης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε επαγωγική εστία μέχρι να ομογενοποιηθούν τα υλικά. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min. Το τελικό pH ήταν  $7,1 \pm 0,2$  σε θερμοκρασία 25 °C. Έπειτα το θρεπτικό αφέθηκε σε υδατόλουτρο για να κρυώσει σε θερμοκρασία μεταξύ των 45 °C με 50 °C και υπό ασηπτικές συνθήκες προστέθηκε σε αυτό ένα φιαλίδιο με εκλεκτικό υλικό CFC, αφού προηγήθηκε διάλυση του εκλεκτικού σε 5 ml αποστειρωμένο νερό με 50 % αιθανόλη. Τέλος πραγματοποιήθηκε η διαδικασία ενσωμάτωσης, όπου μικρή ποσότητα θρεπτικού μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Αφέθηκε σε κατάσταση ηρεμίας ώσπου να στερεοποιηθεί πλήρως στα τρυβλία και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 5-10 °C για μελλοντική χρήση.

#### 2.2.1.3. Βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*

Ο προσδιορισμός των βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar) (LAB088). Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των εντεροβακτηριδίων σε τρόφιμα. Αποτελεί ένα εκλεκτικό υλικό λόγω της δράσης των χολικών (biles) αλάτων και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) επιτρέποντας έτσι μόνο την ανάπτυξη στα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Αυτό συμβαίνει καθώς η ζελατίνη από ενζυματική πέψη παρέχει άζωτο (N), αμινοξέα και άνθρακα (C), η δεξτρόζη παρέχει υδατάνθρακες (H/C) ενώ παράλληλα το εκχύλισμα ζύμης αποτελεί μια εξαιρετική πηγή βιταμινών που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η αντίδραση των βακτηρίων με τη δεξτρόζη προκαλεί τον κόκκινο χρωματισμό των αποικιών με ένα κόκκινο-μωβ φωτοστέφανο, παρουσία του δείκτη pH (ουδέτερο κόκκινο, Neutral red). Τα συστατικά αυτού του υλικού φαίνονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4:** Συστατικά του υλικού VRBGA σε g/1000 ml.

Yeast Extract	3,0
Peptone	7,0
Sodium Chloride	5,0
Bile Salts	1,50
Glucose	10,0
Neutral Red	0,03
Crystal Violet	0,002
Agar	12,0

#### **2.2.1.4. Μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta***

Ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* είναι ένας από τους κυριότερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση στα τρόφιμα τα οποία διατηρούνται σε συνθήκες ψύξης. Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός με εύρος ανάπτυξης σε θερμοκρασίες από 0 έως 30 °C, με βέλτιστο σημείο τους 20 έως 25 °C. Ως προαιρετικά αναερόβιο, το *Brochothrix thermosphacta*, είναι ικανό να αναπτυχθεί και σε συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP). Για την καταμέτρηση αυτών των μικροοργανισμών χρησιμοποιείται το υλικό STAA (Streptomycin Sulphate-Thallus Acetate-Cycloheximide Actidione Agar) το οποίο προέρχονταν από την Biolife Italiana srl (Milano, Italy). Τα συστατικά από τα οποία αποτελείται έχουν την ιδιότητα να παρέχουν τις απαραίτητες αζωτούχες ενώσεις, τις βιταμίνες και άλλα συστατικά που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού ενώ αντίθετα η στρεπτομυκίνη είναι ένας εκλεκτικός παράγοντας που αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών, εκτός των συγκεκριμένων. Στους παρακάτω Πίνακες (Πιν.5, Πιν.6) απεικονίζονται τα συστατικά που απαιτούνται για την παρασκευή του.



**Πίνακας 5:** Συστατικά του υλικού STAA σε g/1000 ml.

Peptic Digest of Animal Tissue	20,0
Yeast Extract	2,0
Dipotassium Hydrogen Phosphate	1,0
Magnesium Sulphate, Heptahydrate	1,0
Agar	13,0

**Πίνακας 6:** Συστατικά εκλεκτικού μέσου STAA (κάθε φιαλίδιο περιέχει ποσότητα mg/500 ml θρεπτικού)

Streptomycin Sulphate	250
Thallus Acetate	25

#### **Διαδικασία παρασκευής:**

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν 17,3 g από το υλικό και στη συνέχεια προστέθηκαν 500 ml απιονισμένο νερό και 7,5 g γλυκερόλη. Το θρεπτικό υλικό υπέστη θέρμανση μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα και μετά αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121 °C για 15 min. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφέθηκε να κρυώσει σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία μεταξύ των 45 με 50 °C και έπειτα προστέθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες ένα φιαλίδιο με εκλεκτικό μέσο STAA διαλυμένο σε 5 ml αποστειρωμένο νερό. Το τελικό pH ήταν  $7,0 \pm 0,1$ . Στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri, αφέθηκε να σταθεροποιηθεί και τοποθετήθηκε στο ψυγείο.

#### **2.2.1.5. Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H<sub>2</sub>S)**

Το Iron Agar (LAB53) χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο (H<sub>2</sub>S). Η καζεΐνη και οι ιστοί ζώων από ενζυματική πέψη και η εμπλουτισμένη με μαγιά πεπτόνη, παρέχουν άζωτο (N), άνθρακα (C) και τις βιταμίνες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των

μικροοργανισμών. Επίσης παρέχει τρεις υδατάνθρακες (H/C), τη δεξτρόζη, τη λακτόζη και την σακχαρόζη. Όταν οι υδατάνθρακες (H/C) αυτοί υποστούν ζύμωση, παράγεται οξύ το οποίο ανιχνεύεται από τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το θειοθειικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$ ) ανάγεται προς υδρόθειο ( $\text{H}_2\text{S}$ ), αντιδρά με τα άλατα του σιδήρου Fe και αποδίδει ένα τυπικό μαύρο χρώμα (σουλφίδιο του σιδήρου (Fe)) στις αποικίες. Στον Πίνακα 7 αναφέρονται τα συστατικά από τα οποία αποτελείται.

**Πίνακας 7:** Συστατικά του υλικού ΙΑ σε g/1000 ml.

Beef Extract	3,0
Yeast Extract	3,0
Balanced Peptone N° 1	20,0
Sodium Chloride	5,0
Lactose	10,0
Ferric citrate	0,3
Sucrose	10,0
Glucose	1,0
Sodium Thiosulphate	0,3
Phenol Red	0,025
Agar N° 2	12,0

#### **Διαδικασία παρασκευής:**

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν 65,0 g θρεπτικού υλικού και 1000 ml απιονισμένο νερό. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο στην θερμοκρασία των 121 °C για 15 min. Στη συνέχεια αφέθηκε σε υδατόλουτρο μεταξύ των 45 έως 50 °C ώσπου να κρυώσει και έπειτα μοιράστηκε σε τρυβλία Petri και όταν σταθεροποιήθηκε τοποθετήθηκε στο ψυγείο.

#### **2.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων για καταμέτρηση της μικροβιακής χλωρίδας - παρασκευή αραιώσεων**

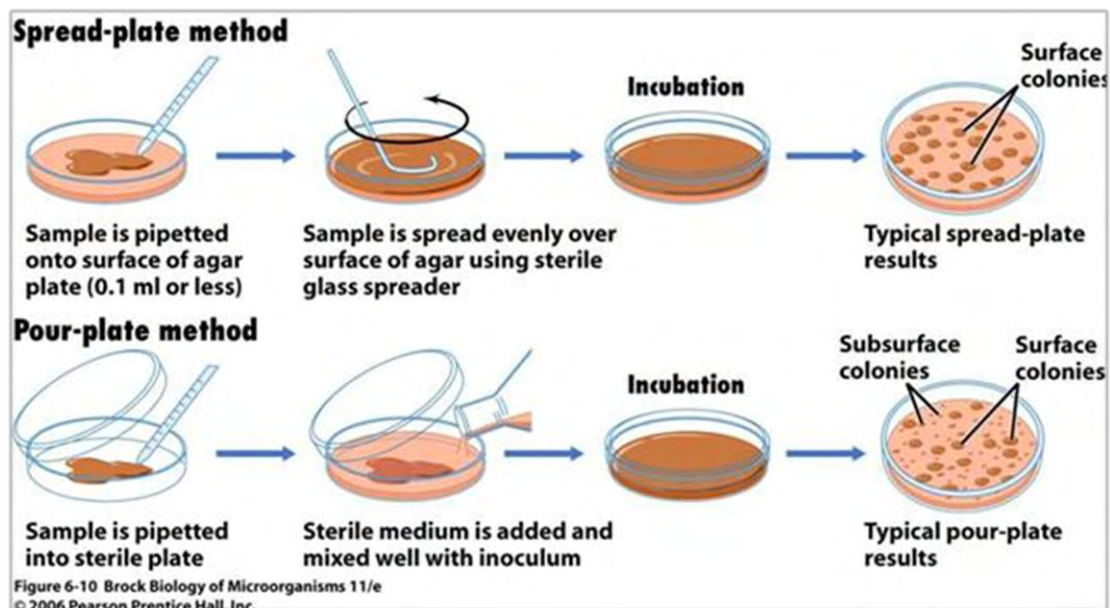
Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων για την καταμέτρηση της μικροβιακής χλωρίδας των φιλέτων τσιπούρας πραγματοποιήθηκε αρχικά κάτω από ασηπτικές

συνθήκες λήψη 10g σάρκας από κάθε φιλέτο τσιπούρας με χρήση λαβίδας και νυστεριού, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα τύπου Stomacher. Έπειτα στην σακούλα που περιέχονταν η σάρκα έγινε προσθήκη 90 ml αραιωτικού διαλύματος MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.85 % w/v NaCl, 0.1 % w/v peptone) και ακολούθησε ομογενοποίηση του μείγματος σε συσκευή ομογενοποίησης (BagMixer 400 VW, Interscience, London, UK), όπου τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 30 sec. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων, με μεταφορά 1 ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου MRD. Λαμβάνονταν δείγμα από δύο διαφορετικά φιλέτα (n=2) σε κάθε μέτρηση. Μετρήσεις πραγματοποιούνταν για τα φιλέτα τσιπούρας που διατηρούνταν σε θερμοκρασία των 2 °C ανά τρεις ημέρες και για τα φιλέτα που διατηρούνταν σε θερμοκρασία των -1,5 °C ανά πέντε ημέρες.

Μετά την πραγματοποίηση της ομογενοποίησης του δείγματος ακολούθησε ενοφθαλμισμός του βακτηριακού εναιωρήματος από κάθε αραιώση σε θρεπτικό υπόστρωμα με τη χρήση 2 τεχνικών, αυτών της επίστρωσης και της ενσωμάτωσης.

Η πρώτη τεχνική, αυτή της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) ακολούθηθηκε για τα θρεπτικά υλικά TSA, STAA και CFC. Εφαρμόζεται, γενικά, στους αερόβιους μικροοργανισμούς. Σύμφωνα με αυτή την τεχνική ποσότητα 0.1 ml από το βακτηριακό εναιώρημα επιστρώνεται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού που έχει τοποθετηθεί σε τρυβλία Petri και με την βοήθεια ειδικής ράβδου επίστρωσης, γυάλινης ή πλαστικής. Έπειτα από επώαση αυτών στην κατάλληλη θερμοκρασία και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, οι αποικίες που εμφανίζονται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού μετρούνται.

Η δεύτερη τεχνική, αυτής της ενσωμάτωσης (pour plate technique) ακολούθηθηκε για τα θρεπτικά υλικά Iron Agar και VRBGA. Αρχικά εμβολιάζεται στο τρυβλίο 1 ml από το βακτηριακό εναιώρημα του δείγματος και κατόπιν προστίθεται το τηγμένο θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια ακολουθεί προσεκτική ανάδευση με κυκλική κίνηση για ανάμιξη του βακτηριακού εναιωρήματος με το θρεπτικό υλικό και αφού το θρεπτικό υλικό έχει πλέον στερεοποιηθεί, μεταγγίζεται επιπλέον ποσότητα θρεπτικού υλικού (overlay). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς. Έπειτα από επώαση αυτών στην κατάλληλη θερμοκρασία και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, οι αποικίες που εμφανίζονται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού μετρούνται.



Εικόνα 2.2.2.1.: Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) και τεχνική ενσωμάτωσης (pour plate technique).

### 2.2.3. Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών

Αφού προηγήθηκε η επώαση των δειγμάτων στα διάφορα θρεπτικά υλικά που στόχευαν σε διαφορετικούς πληθυσμούς βακτηρίων το καθένα, ακολούθησε η καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών.

Οι μικροοργανισμοί που καταμετρήθηκαν ήταν οι παρακάτω:

α) η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα σε θρεπτικό υλικό TSA (Tryptone Soy Agar) ύστερα από επώαση των τρυβλίων σε θερμοκρασία των 25 °C για χρονικό διάστημα 48 έως 72 h,

β) τα βακτήρια που παράγουν H<sub>2</sub>S στο θρεπτικό μέσο IA (Iron Agar), με απαρίθμηση μόνο των μαύρων αποικιών, έπειτα από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48 έως 72 h,

γ) τα βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae σε θρεπτικό υλικό VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar) με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο, μετά από επώαση σε θερμοκρασία των 37 °C για 24 έως 48 h ,

δ) τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. σε θρεπτικό υλικό CFC (Cetrimide-Fucidin-Cephaloridine agar) με καταμέτρηση των αποικιών, ύστερα από επώαση στους 25 °C για 48 h και

ε) οι μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta* σε θρεπτικό μέσο STA Agar με καταμέτρηση των αποικιών κίτρινου χρώματος, μετά από επώαση στους 25 °C για 48 έως 72 h.

### 2.3. Οργανοληπτική ανάλυση

Πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ποιότητας των ψαριών. Οι οργανοληπτικές μέθοδοι παραμένουν οι πιο ικανοποιητικές όσον αφορά την αξιολόγηση της φρεσκότητας και της ποιότητας των ψαριών (Connell 1975, Howgate 1982, Ólafsdóttir et al. 1997). Κατά την οργανοληπτική ανάλυση των ιχθύων γίνεται χρήση μιας ή περισσότερων από τις πέντε αισθήσεις για να κριθεί ή να διαμορφωθεί μια άποψη σχετικά με την ποιότητά τους. Για αυτό το σκοπό χρειάζεται ένας ή περισσότεροι αξιολογητές, οι οποίοι εξετάζουν το δείγμα χρησιμοποιώντας μία ή περισσότερες ανθρώπινες αισθήσεις, δηλαδή αυτές της όρασης, της οσμής, της γεύσης και της υφής, που αντιστοιχούν στις ιδιότητες του προϊόντος όσον αφορά την εμφάνιση, την οσμή, τη γεύση και την υφή του. Μια χημική ή φυσική ιδιότητα του εξεταζόμενου προϊόντος λειτουργεί ως ερέθισμα για το κατάλληλο αισθητήριο όργανο με αποτέλεσμα ένα σήμα να αποστέλλεται από τον υποδοχέα, μέσω των νEURων, στον εγκέφαλο όπου ερμηνεύεται για να προκαλέσει μια απάντηση (Howgate 1992).

Η οργανοληπτική ανάλυση των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας συμπεριελάμβανε την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών της εμφάνισης, της οσμής, και της συνεκτικότητας της σάρκας κατά ISO 8586-1 (1983) (Πίν. 9) αλλά και της γεύσης.

Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με χρήση μιας πενταβάθμιας κλίμακας αρέσκειας (hedonic scale) από το 5,0 έως το 1,0, κατά την οποία ο βαθμός 5,0 συμβολίζει το Εξαιρετικό, ο βαθμός 4,0 το Πολύ καλό, ο βαθμός 3,0 το Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό, ο βαθμός 2,0 το Μη αποδεκτό και ο βαθμός 1,0 το Αλλοιωμένο. Στο βαθμό 2,0 το προϊόν είναι υποβαθμισμένο και μη αποδεκτό, ενώ στο 1,0 έχει επέλθει προχωρημένη αλλοίωση. Οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων έλαβε χώρα σε κάθε δειγματοληψία πριν από την έναρξη των μικροβιολογικών αναλύσεων και η αξιολόγηση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν από πέντε (5) κριτές.

Η βαθμολογία για κάθε χαρακτηριστικό προέκυψε από το μέσο όρο των βαθμολογιών των πέντε (5) κριτών.

Η αξιολόγηση της γεύσης των δειγμάτων, έγινε επίσης με χρήση της πενταβάθμιας κλίμακας αρέσκειας, αφού πρώτα τυλίχθηκαν σε αλουμινόχαρτο και ψήθηκαν σε προθερμασμένο φούρνο στους 200 °C για 20 λεπτά. Η βαθμολογία είχε ως εξής: 5,0 για την εξαιρετική και έντονη γεύση, 4,0 για την αρκετά καλή του γεύση, 3,0 για την ουδέτερη γεύση του, δηλαδή άνοστο αλλά χωρίς άσχημη γεύση, 2,0 για την σχετικά ξινή του γεύση και 1,0 για την πικρή και ανεπιθύμητη γεύση του.

Τέλος ως χρόνος απόρριψης ορίστηκε ο χρόνος όπου το προϊόν βαθμολογήθηκε έστω και από έναν από τους πέντε (5) κριτές με βαθμό κάτω από 3,0, ενώ ο εμπορικός χρόνος ζωής ορίζεται ως τη χρονική στιγμή προτού απορριφθεί το προϊόν.

**Πίνακας 9:** Κριτήρια αρεσκείας για την αξιολόγηση της ποιότητας με χρήση των αισθήσεων σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας.

	<b>5 ΒΑΘΜΟΙ</b> <b>(Άριστο)</b>	<b>4 ΒΑΘΜΟΙ</b> <b>(Πολύ καλό)</b>	<b>3 ΒΑΘΜΟΙ</b> <b>(Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό)</b>	<b>2 ΒΑΘΜΟΙ</b> <b>(Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό)</b>	<b>1 ΒΑΘΜΟΣ</b> <b>(Αλλοιωμένο)</b>
<b>Εμφάνιση</b>	Ημιδιαφανές, γυαλιστερό	Ελαφριά έλλειψη λαμπρότητας	Αισθητή απώλεια λαμπρότητας	Θαμπό, ξεθωριασμένο, αιματοβαμμένο	Εξαιρετικά θαμπό, ξεθωριασμένο, αιματοβαμμένο
<b>Συνεκτικότητα σάρκας</b>	Σφικτή	Λιγότερο σφικτή	Ελαφριά μαλακή	Αρκετά μαλακή	Πολύ μαλακή, διαλύεται
<b>Οσμή</b>	Έντονα θαλασσινή	Ελαφρά θαλασσινή	Ούτε θαλασσινή, ούτε δυσάρεστη	Δυσάρεστη	Πολύ δυσάρεστη

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Οργανοληπτική ανάλυση

Όλα τα φιλέτα ιχθύων τσιπούρας που φυλάσσονταν κάτω υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 2 °C την πρώτη ημέρα (d1) αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά ως «Εξαιρετικά», με βαθμό 5,0 και εξακολούθησαν να παραμένουν σε κατάσταση «Εξαιρετική» έως και την τρίτη ημέρα συντήρησής τους με βαθμολογία από 4,5 έως 5,0. Έπειτα από έξι μέρες συντήρησής τους (d6) η κατάστασή τους χαρακτηρίστηκε από «Πολύ καλή», με βαθμολογία από 3,4 έως 4,0, ενώ με το πέρας των ημερών άρχισε να επέρχεται σημαντική υποβάθμιση της ποιότητάς τους καθώς την ένατη μέρα (d9) τα φιλέτα ιχθύων τσιπούρας βαθμολογήθηκαν από 2,0 έως 3,0 με αποτέλεσμα να απορρίπτονται ως «Υποβαθμισμένα και μη αποδεκτά». Την δωδέκατη μέρα (d12) το δείγμα είχε αλλοιωθεί πλήρως, με βαθμό 1,0.

Συμπερασματικά, ο χρόνος απόρριψης των φιλέτων τσιπούρας που ήταν αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 2 °C σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση, ήταν 9 ημέρες (216 h), ενώ ο εμπορικός χρόνος ζωής προσδιορίστηκε στις 6 ημέρες (144 h).

**Πίνακας 10:** Βαθμολογία οργανοληπτικών χαρακτηριστικών για φιλέτα ιχθύων τσιπούρας που φυλάσσονταν υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 2 °C.

Χρόνος (ημέρες)	οσμή 1	οσμή 2	γεύση 1	γεύση 2	εμφάνιση 1	εμφάνιση 2
0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
3	5,0	4,7	4,8	4,6	5,0	4,5
6	4,2	3,8	4,0	3,5	3,9	3,4
9	3,0	2,5	2,8	2,0	3,0	2,2
12	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
15	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Τα φιλέτα τσιπούρας που ήταν αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους -1,5 °C αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά ως «Εξαιρετικά», με βαθμό 5,0 την

πρώτη ημέρα (d1) και παρέμειναν «Εξαιρετικά» έως και την πέμπτη ημέρα (d5) συντήρησής τους. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης άρχισε να λαμβάνει χώρα υποβάθμιση, με αποτέλεσμα την δέκατη μέρα (d10) τα φιλέτα τσιπούρας να βαθμολογηθούν με βαθμούς από 3,2 έως και 4,0 και η κατάστασή τους να χαρακτηριστεί ως «Πολύ καλή». Την δέκατη πέμπτη μέρα (d15) τα περισσότερα φιλέτα βαθμολογήθηκαν με 3,0 έως 3,5 και χαρακτηρίστηκαν ως «Υποβαθμισμένα αλλά αποδεκτά». Την εικοστή μέρα (d20) τα φιλέτα βαθμολογήθηκαν με βαθμούς από 2,0 έως και 1,0 και έτσι χαρακτηρίστηκαν ως αλλοιωμένα ενώ την εικοστή πέμπτη μέρα (d25) είχαν επέλθει σε πλήρη αλλοίωση, με βαθμό 1,0.

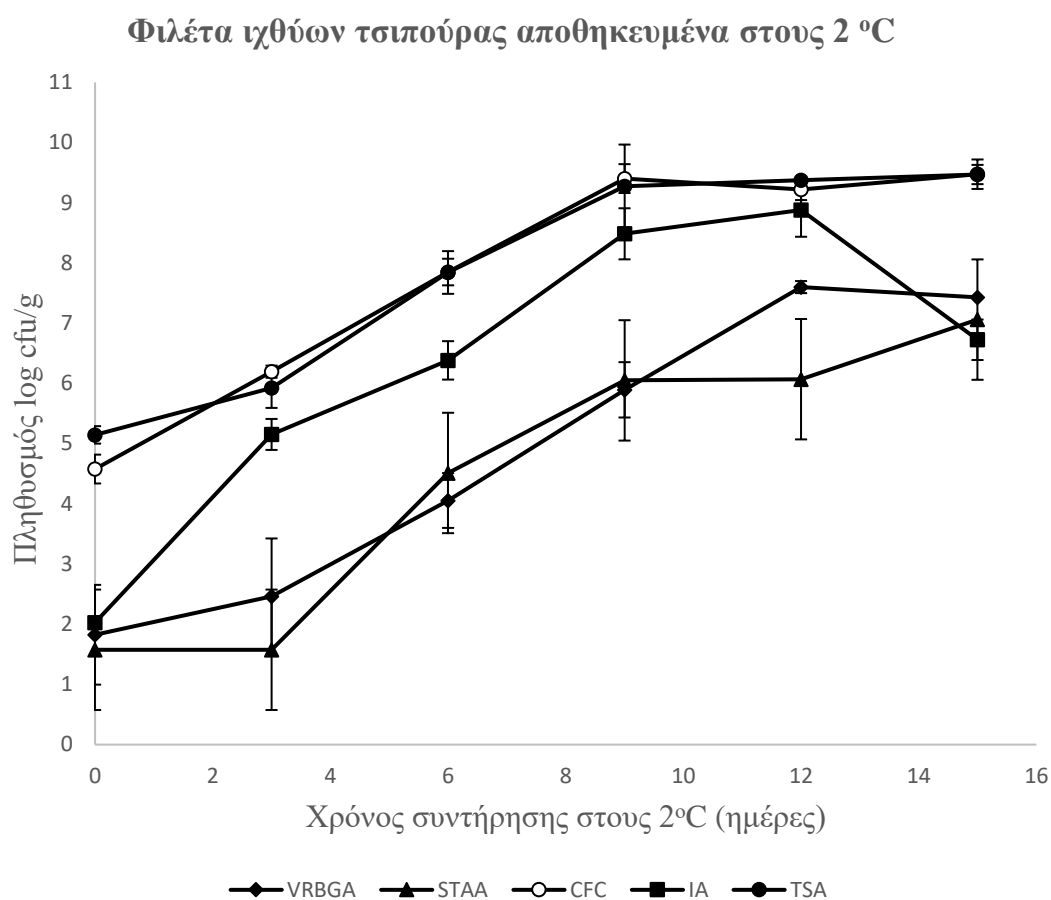
Οπότε, σύμφωνα με όσα αναφέρονται παραπάνω ο χρόνος απόρριψης των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας που ήταν αποθηκευμένα κάτω από αερόβιες συνθήκες ψύξης στους  $-1,5^{\circ}\text{C}$ , ήταν 20 ημέρες (480 h), ενώ ο εμπορικός χρόνος ζωής τους ήταν 15 ημέρες (360 h).

**Πίνακας 11:** Βαθμολογία οργανοληπτικών χαρακτηριστικών για φιλέτα ιχθύων τσιπούρας που φυλάσσονταν υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους  $-1,5^{\circ}\text{C}$ .

Χρόνος (ημέρες)	οσμή 1	οσμή 2	γεύση 1	γεύση 2	εμφάνιση 1	εμφάνιση 2
0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
10	4,0	4,0	3,2	4,0	3,5	4,0
15	3,5	3,4	3,0	3,0	3,2	3,0
20	1,5	2,0	1,0	2,0	1,6	2,0
25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0



### 3.2. Μικροβιολογική σύνθεση



**Σχήμα 3.2.1.:** Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX [TSA] και των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύων τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 2 °C. Τα σημεία που απεικονίζονται αντιστοιχούν στους μέσους όρους 4 επαναλήψεων (2X2=4) που προέκυψαν έπειτα από απαρίθμηση των μικροοργανισμών. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.* [CFC], βακτήρια που παράγουν H<sub>2</sub>S [IA], βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* [VRBGA], μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta* [STAA].

Στο **Σχήμα 3.2.1.** απεικονίζονται οι πληθυσμιακές μεταβολές της OMX, όπως επίσης και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών των φιλέτων τσιπούρας που φυλάσσονται σε αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 2 °C. Τους κυριότερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς αποτελούν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.* και τα βακτήρια που παράγουν H<sub>2</sub>S.

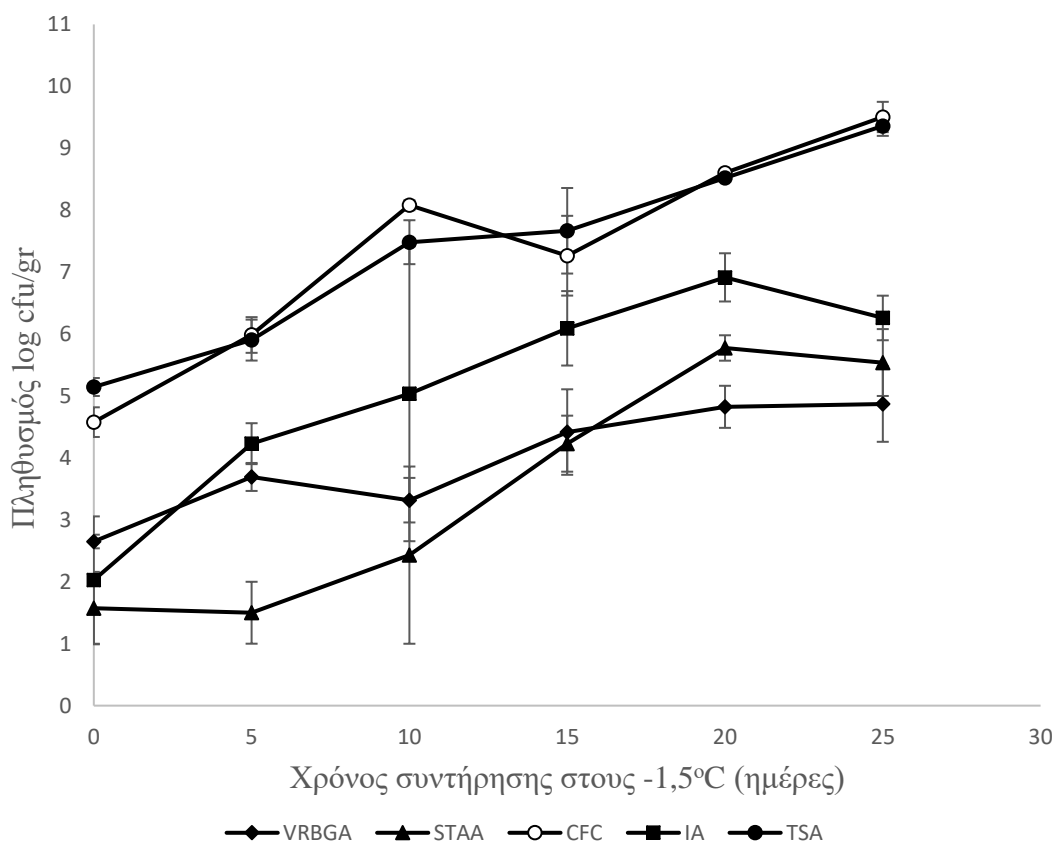
Οι μικροβιακοί πληθυσμοί στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 0, d0), όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα, ήταν 5,15 log cfu/g για την OMX, 1,83 log cfu/g για τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, 1,56 log cfu/g για τα *Brochothrix thermosphacta*, 4,58 log cfu/g για τα *Pseudomonas spp.* και 2,03 log cfu/g για τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια.

Την ημέρα που προσδιορίστηκε ως εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας στους 2 °C (ημέρα 6, 144h) ο πληθυσμός για την OMX ανερχόταν σε 7,84 log cfu/g, για τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* 4,06 log cfu/g, για τους μικροοργανισμούς *Brochothrix thermosphacta* 4,51 log cfu/g, για τα *Pseudomonas spp.* 7,85 log cfu/g και τέλος για τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια 6,38 log cfu/g.

Την ημέρα που πραγματοποιήθηκε η απόρριψη των ιχθύων στους 2 °C (ημέρα 9, 216h) οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών είχαν φτάσει για την OMX τα 9,28 log cfu/g, για τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* τα 5,89 log cfu/g, για τα *Brochothrix thermosphacta* τα 6,05 logcfu/g, για τα *Pseudomonas spp.* τα 9,4 log cfu/g και για τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια τα 8,49 log cfu/g.

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 15, d15), οι μικροβιακοί πληθυσμοί είναι φανερό από το παραπάνω σχήμα ότι είχαν αυξηθεί, με αποτέλεσμα η OMX να φτάνει τα 9,47 log cfu/g, τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* τα 7,43 log cfu/g, οι μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta* τα 7,06 log cfu/g, τα *Pseudomonas spp.* τα 9,48 log cfu/g, ενώ τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια τα 6,73 log cfu/g.

### Φιλέτα ιχθύων τσιπούρας αποθηκευμένα στους -1,5 °C



**Σχήμα 3.2.2.:** Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX [TSA] και των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύων τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες ψύξης στους -1,5 °C. Τα σημεία που απεικονίζονται αντιστοιχούν στους μέσους όρους 4 επαναλήψεων (2X2=4) που προέκυψαν έπειτα από απαρίθμηση των μικροοργανισμών. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. [CFC], βακτήρια που παράγουν H<sub>2</sub>S [IA], βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* [VRBGA], μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta* [STAA].

Στο **Σχήμα 3.2.2.** παρουσιάζονται οι πληθυσμιακές μεταβολές της OMX, αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που επικρατούν κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας σε αερόβιες συνθήκες υπέρψυξης στους -1,5 °C. Οι κυριότεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί αποτελούνται από τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και τα βακτήρια που παράγουν H<sub>2</sub>S.

Κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 0, d0), όπως απεικονίζεται και στο παραπάνω σχήμα, οι μικροβιακοί πληθυσμοί ήταν της τάξεως των 5,15 log cfu/g για την OMX, 2,65 log cfu/g για τα βακτήρια της οικογένειας

*Enterobacteriaceae*, 1,56 log cfu/g για τα *Brochothrix thermosphacta*, 4,58 log cfu/g για τα *Pseudomonas spp.* και 2,03 log cfu/g για τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια.

Ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας που συντηρούνταν στους -1,5 °C προσδιορίστηκε την ημέρα 15 (360h), όπου οι μικροβιακοί πληθυσμοί ήταν για την OMX 7,67 log cfu/g, για τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* 4,42 log cfu/g, για τα *Brochothrix thermosphacta* 4,23 log cfu/g, για τα *Pseudomonas spp.* 7,27 log cfu/g και για τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια 6,09 log cfu/g.

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί την ημέρα απόρριψης των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας (ημέρα 20, 480h) ανέρχονταν σε 8,52 log cfu/g για την OMX, 4,83 logcfu/g για τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, 5,76 logcfu/g για τα *Brochothrix thermosphacta*, 8,6 log cfu/g για τα *Pseudomonas spp.* και 6,92 log cfu/g για τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια.

Στο πέρας της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 25, d25), όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα, οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών είχαν αυξηθεί αρκετά. Έτσι οι μικροβιακοί πληθυσμοί για την OMX ήταν 9,36 log cfu/g, 4,87 log cfu/g για τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, 5,54 log cfu/g για τους μικροοργανισμούς *Brochothrix thermosphacta*, 9,51 log cfu/g για τα είδη *Pseudomonas* και 6,26 log cfu/g για τα βακτήρια που παράγουν H<sub>2</sub>S.

Είναι φανερό ότι οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν με ταχύτερο ρυθμό και στις δύο θερμοκρασίες (2 °C και -1,5 °C) όπου διατηρούνταν τα φιλέτα ιχθύων τσιπούρας είναι αυτοί του γένους *Pseudomonas* και οι επόμενοι, ταχέως αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί είναι τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένων και των *Shewanella putrefasciens*). Τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και οι μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta* έδειξαν χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης πληθυσμού κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και στις δύο θερμοκρασίες και παρέμειναν σε χαμηλότερα επίπεδα στο τέλος αυτής. Επομένως ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (EAM) για τα φιλέτα ιχθύων τσιπούρας, που διατηρούνταν υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης και υπέρψυξης αποτελούν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ως αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να θεωρηθεί οποιαδήποτε αλλαγή που καθιστά ένα προϊόν μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση (Hayes 1985) και συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση αλλαγών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (οσμή, γεύση, εμφάνιση, υφή). Τα αλιευτικά προϊόντα αλλοιώνονται ταχύτατα, εξαιτίας διάφορων μηχανισμών αλλοίωσης. Η αλλοίωση μπορεί να προκληθεί από τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, από ενδογενή ενζυμική δραστηριότητα και από χημική οξείδωση των λιπιδίων (Ashie et al. 1996, Gramm & Huss 1996, Huis in't Veld 1996).

Οι Ghaly et al. (2010) αναφέρουν ότι περίπου το 30% των εκφορτωθέντων ψαριών χάνονται μόνο εξαιτίας της μικροβιακής δραστηριότητας, ενώ η χημική υποβάθμιση και η μικροβιακή αλλοίωση ευθύνονται για την απώλεια 25% των ακαθάριστων πρωτογενών γεωργικών και αλιευτικών προϊόντων κάθε χρόνο. Ο έλεγχος των μικροβιακών δραστηριοτήτων είναι το κλειδί για την επέκταση της διάρκειας ζωής κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, της διανομής και της αποθήκευσης των τροφίμων και αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση διάφορων μεθόδων συντήρησης, όπως η ψύξη και υπέρψυξη (μέθοδος superchilling), καθώς η θερμοκρασία είναι μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Borch et al. 1996, Bréand et al. 1997, Constantin 1985, Doyle 1989).

Η ποιότητα των προϊόντων αναφέρεται στις διατροφικές, μικροβιολογικές, βιοχημικές και φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών. Η μικροβιακή ανάπτυξη, το χρώμα, η υφή, το άρωμα, η γεύση και η οξείδωση είναι σημαντικοί παράγοντες για την ασφάλεια αλλά και την ποιότητα των προϊόντων διατροφής. Οι κύριες παράμετροι ποιότητας στα τρόφιμα αφορούν τα χαρακτηριστικά του χρώματος, της υφής, του αρώματος και της γεύσης (Kaale et al. 2011), με αποτέλεσμα η οργανοληπτική ανάλυση να αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση των μεταβολών της ποιότητας των θαλασσινών κατά την αποθήκευση (Chun-hua 2014)

Στην παρούσα μελέτη ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων τσιπούρας, που συντηρούνταν υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 2 °C και υπέρψυξης στους -1,5 °C, έπειτα από την οργανοληπτική τους αξιολόγηση, προσδιορίστηκε στις 6 ημέρες (144h) και 15 ημέρες (360h) αντίστοιχα. Ο χρόνος που προσδιορίστηκε ως χρόνος απόρριψης

των ιχθύων στους 2 °C ήταν οι 9 ημέρες (216h) ενώ στους -1,5 °C ήταν οι 20 ημέρες (480h).

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η αποθήκευση φιλέτων σε υπέρψυξη μπορεί να επεκτείνει την περίοδο διατήρησης της φρεσκότητας τους (Martinsdóttir et al. 2005). Μελέτες σχετικά με την αποθήκευση σε συνθήκες υπέρψυξης έδειξαν εκτεταμένη διάρκεια ζωής των προϊόντων διατροφής σε σύγκριση με τη συμβατική ψύξη (Kaale et al. 2011) και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αυτό. Σύμφωνα με τον Einarsson (1988), η μέθοδος superchilling έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη ποιότητα και την επέκταση της διάρκειας του χρόνου ζωής των αποθηκευμένων τροφίμων από 1,5 έως 4 φορές σε σύγκριση με τη συμβατική ψύξη. Ο Carlson (1969) επανεξέτασε τη μέθοδο superchilling για τη συντήρηση των ψαριών και διαπίστωσε ότι καθώς η θερμοκρασία μειώθηκε από -1 °C σε -3 °C, η διάρκεια ζωής των ψαριών αυξήθηκε από 21 σε 35 ημέρες. Οι Sivertsvik et al. (2003), ανέφεραν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων σολομού σε αερόβιες συνθήκες υπέρψυξης είναι 21 ημέρες ενώ τα αποθηκευμένα σε αέρα φιλέτα σε συνθήκες ψύξης είχαν υποστεί αλλοίωση ως εκείνη τη χρονική στιγμή. Οι Lauson et al. (2010) συμπέραναν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής φιλέτων μπακαλιάρου αποθηκευμένων σε υπέρψυξη στους -1 °C είναι μεγαλύτερος (15-17 ημέρες) σε σύγκριση με την αποθήκευση των φιλέτων σε ψύξη στους 0.5 °C (12-13 ημέρες). Οι Duun & Rustad (2008), διαπίστωσαν το διπλασιασμό της διάρκειας ζωής του σολομού που φυλάσσεται στους -1,4 °C και -3,6 °C σε σύγκριση με την αποθήκευση σε πάγο έπειτα από μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις. Σύμφωνα με τους Olafsdottir et al. (2006) η διάρκεια ζωής των φιλέτων μπακαλιάρου, σε συνθήκες superchilling είναι 15 ημέρες σε θερμοκρασία -1,5 °C σε σύγκριση με 12,5-14 ημέρες που είναι η διάρκεια ζωής τους σε πάγο (0 °C). Οι Olafsdottir et al. (2006), διερεύνησαν τις μεταβολές της ποιότητας των φιλέτων μπακαλιάρου (*Gadus morhua*) σε συνθήκες superchilling, με οργανοληπτική ανάλυση και την επίδραση των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας στην οργανοληπτική αξιολόγηση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Αποδείχθηκε ότι με τη χρήση της μεθόδου superchilling ακολουθούμενη από αποθήκευση στους -1,5 °C επέκτεινε τη διάρκεια ζωής των φιλέτων για τουλάχιστον 3 ημέρες σε σύγκριση με την διαδικασία ψύξης σε θερμοκρασία 0,5 °C, με αποτέλεσμα συνολική διάρκεια ζωής 15 ημέρες. Πράγματι οι Cyprian et al. (2012), αναφέρουν πως η διάρκεια ζωής φιλέτων τιλάπιας του Νείλου (*Oreochromis niloticus*), αποθηκευμένων σε αερόβιες συνθήκες, σε ψύξη σε θερμοκρασία 1 °C και υπέρψυξη στους -1 °C, ύστερα από οργανοληπτική

αξιολόγηση των δειγμάτων, είναι 13-15 ημέρες για τα φιλέτα που ήταν αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες στους 1 °C και 20 ημέρες για αυτά που ήταν αποθηκευμένα στους -1°C. Ο Lauzon (1997, 2000) διαπίστωσε ότι ολόκληρη και εκσπλαχνισμένη γλώσσα (*Hippoglossoides platessoides*) αποθηκευμένη σε θερμοκρασία -1,7 °C σε αερόβιες συνθήκες παρουσίασε εκτεταμένο εμπορικό χρόνο ζωής (14 ημέρες) σε σχέση με την αποθήκευση σε θερμοκρασία 0,6 °C (12 ημέρες).

Έπειτα από έρευνα οι Parlapani et al. (2015a) διαπίστωσαν, ύστερα από οργανοληπτική αξιολόγηση, ότι η διάρκεια ζωής των φιλέτων τσιπούρας αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 0 °C και 5 °C, ήταν 14 και 5 ημέρες αντίστοιχα. Οι Parlapani et al. (2015b), ανέφεραν ότι ο χρόνος ζωής ολόκληρης εκσπλαχνισμένης τσιπούρας που φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2 °C βρέθηκε να είναι 9 ημέρες. Ομοίως, οι Ozogul et al. (2007) διαπίστωσαν ότι ο χρόνος ζωής σε ολόκληρη εκσπλαχνισμένη τσιπούρα τυλιγμένη σε φύλλο αλουμινίου και φιλμ και αποθηκευμένη στους 2 °C ήταν 8 ημέρες. Οι Parlapani et al. (2014) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η διάρκεια ζωής των φιλέτων τσιπούρας αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες, προσδιοριζόμενη με οργανοληπτική αξιολόγηση, βρέθηκε να είναι 14, 5 και 2 ημέρες στους 0 °C, 5 °C και 15 °C αντίστοιχα. Οι Parlapani & Boziaris (2016) ανέφεραν πως ο χρόνος ζωής της τσιπούρας που προσδιορίστηκε με οργανοληπτική αξιολόγηση ήταν 16, 5 και 2 ημέρες στους 0 °C, 5 °C και 15 °C αντίστοιχα. Άλλοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η διάρκεια ζωής των φιλέτων τσιπούρας που φυλάσσονται στους 5 °C κυμαινόταν συνήθως από 4 έως 7 ημέρες (Tsironi & Taoukis 2011, Tsironi 2009). Οι Parlapani et al. (2015c) ανέφεραν ότι η διάρκεια ζωής των εκτρεφόμενων λαβρακιών που φυλάσσονταν στους 2 °C υπό αερόβιες συνθήκες ήταν 9 ημέρες, ύστερα από οργανοληπτική αξιολόγηση. Οι Lauzon et al. (2010) ανέφεραν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής φιλέτων μπακαλιάρου αποθηκευμένων σε θερμοκρασία 0-1 °C κυμαίνεται από 10 έως 13 ημέρες. Ακόμη, οι Parlapani et al. (2013) συμπέραναν ότι η διάρκεια ζωής της τσιπούρας στον πάγο που προσδιορίστηκε με οργανοληπτική αξιολόγηση ήταν 16 ημέρες, ενώ ο εμπορικός χρόνος ζωής της τσιπούρας αποθηκευμένης σε πάγο ποικίλλει από 14 έως 16 ημέρες σύμφωνα με τους Cakli et al. (2007) και Kyraia et al. (1997).

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων τσιπούρας που φυλάσσονταν υπό αερόβιες συνθήκες και στις δύο θερμοκρασίες (2 °C και -1,5 °C) αξιολογήθηκαν ως εξαιρετικά από την πρώτη ημέρα αποθήκευσής τους έως και την ημέρα 3 για τα φιλέτα που φυλάσσονταν στους 2 °C, ενώ ως την ημέρα 5 για τα φιλέτα που φυλάσσονταν στους -1,5 °C. Το χρώμα τους ήταν ζοηρό, ημιδιαφανές και λαμπρό, το άρωμα τους

εξέπεμπε σε οσμή φυκιών, θάλασσας, φρεσκάδας, η υφή της σάρκας ήταν ελαστική και λεία και η συνεκτικότητά της ήταν σφικτή, ενώ παράλληλα η γεύση τους ήταν εξαιρετική. Η ποιότητα των φιλέτων διατηρήθηκε σε καλή κατάσταση, λίγο υποβαθμισμένη όμως, ως την ημέρα 6 στους 2 °C και ως την ημέρα 10 στους -1,5 °C, ενώ στους -1,5 °C εξακολούθησαν να διατηρούνται σε καλή κατάσταση έως και την ημέρα 15. Η υποβάθμιση οδήγησε στην απώλεια του έντονου και λαμπού χρωματισμού των φιλέτων, στη μείωση της συνεκτικότητας της σάρκας, στην πρόκληση ενός λιγότερο έντονου θαλασσινού αρώματος που δεν ήταν όμως δυσάρεστο και στην απώλεια της τόσο ευχάριστης γεύσης. Έπειτα άρχισε να λαμβάνει χώρα σημαντική υποβάθμιση, με αποτέλεσμα την απόκτηση ενός θαμπού, ξεθωριασμένου χρωματισμού, μιας όξινης και δυσάρεστης οσμής, το μαλάκωμα της σάρκας και την υποβάθμιση της γεύσης με επακόλουθο την απόρριψή τους την ημέρα 9 και 20 στους 2°C και -1,5°C, αντίστοιχα.

Οι Zeng & Huang (2001), περιέγραψαν τις μεταβολές της ποιότητας των μυών του είδους *Lateolabrax japonicus* κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους στους -3 °C και παρατήρησαν ότι οι βαθμολογίες όσον αφορά τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά στις 10, 20 και 30 ημέρες δεν είχαν σημαντικές διαφορές και τα αποτελέσματα της αποθήκευσης αυτών στις 30 ημέρες εξακολουθούσαν να βρίσκονται στο εύρος της οργανοληπτικής αποδοχής. Οι Parlapani et al. (2015a) ανέφεραν ότι τα χαρακτηριστικά φρεσκότητας, όπως η εμφάνιση (διαυγές, γυαλιστερό, φυσικό χρώμα) και η οσμή (θαλάσσια, εξέπεμπε φρέσκαδα) σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα σε αέρα στους 0 °C παρέμειναν ισχυρά για 6 ημέρες, ενώ στους 5 °C τα χαρακτηριστικά παρέμειναν ισχυρά για 2 και 3 ημέρες. Οι Parlapani et al. (2015b) διαπίστωσαν ότι ολόκληρη εκσπλαχνισμένη τσιπούρα που φυλάσσονταν στους 2 °C παρέμεινε σε επίπεδα πολύ καλής ποιότητας για 3 ημέρες και στη συνέχεια η ποιότητά της διατηρήθηκε καλή από την ημέρα 3 έως την ημέρα 5 και σχεδόν καλή μέχρι την 9η ημέρα ενώ στη συνέχεια, υποβαθμίστηκε σε ακατάλληλη και απορρίφθηκε. Οι Parlapani et al. (2015c) ανέφεραν ότι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά λαβρακιών που φυλάσσονταν στους 2 °C υπό αερόβιες συνθήκες παρέμειναν σε πολύ καλή κατάσταση για 3 ημέρες. Ακόμη, οι Parlapani et al. (2013) συμπέραναν ότι η διάρκεια ζωής της τσιπούρας στον πάγο που προσδιορίστηκε με οργανοληπτική αξιολόγηση ήταν 16 ημέρες, όπου αρχικά η φρεσκότητα των ψαριών ήταν εξαιρετική και μειώθηκε βαθμιαία με το χρόνο.

Κατά την υπέρψυξη, το 5%-30% του νερού αρχίζει να σχηματίζει παγοκρυστάλλους μέσα στα προϊόντα, οδηγώντας σε αυξημένη συγκέντρωση των



διαλυμένων συστατικών εντός της υδατικής φάσης των κυττάρων ή/και των μεσοκυττάρων χώρων καθώς και αναστολή των μικροβιακών και των ενζυμικών δραστηριοτήτων (Aune 2003, Kaale et al. 2013). Ως εκ τούτου, τα προϊόντα μπορούν να διατηρήσουν την αρχική τους ποιότητα και φρεσκότητα για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα (Chun-hua 2014). Πράγματι οι Sivertsvik et al. (2003) δεν εντόπισαν αρνητικές μεταβολές στην υφή του σολομού σε συνθήκες superchilling ούτε σημαντική απώλεια υγρών και αυτό είναι σύμφωνο με το αποτέλεσμα των Duy et al. (2007), οι οποίοι δεν βρήκαν αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα των φιλέτων του είδους *Arctic charr* σε συνθήκες superchilling. Οι Olafsdottir et al. (2012) παρατήρησαν ότι δεν υπήρχε διαφορά στην οσμή, την εμφάνιση ή τη γεύση μεταξύ αποθήκευσης σε πάγο και σε συνθήκες superchilling ολόκληρου μπακαλιάρου πριν από την ημέρα 6, αλλά ο μπακαλιάρος σε υπέρψυξη είχε καλύτερη γεύση και οσμή από ότι ο αποθηκευμένος σε πάγο μπακαλιάρος ως τις 18 ημέρες.

Οι Fik et al. (1988) μέτρησαν την απώλεια υγρών ολόκληρης της ιριδίζουσας πέστροφας (*Satmo gairdneri richardson*) και των φιλέτων που διατηρήθηκαν σε υπέρψυξη στους  $-2^{\circ}\text{C}$ , και το αποτέλεσμα έδειξε ότι παρατηρήθηκε μεγαλύτερη απώλεια υγρών σε ολόκληρο το ψάρι από ότι στα φιλέτα. Αυτές οι πληροφορίες δείχνουν ότι τα εκσπλαχνισμένα ψάρια αλλά και τα φιλέτα ψαριών μπορεί να είναι πιο κατάλληλα για συντήρηση με τη μέθοδο superchilling από ότι τα ολόκληρα ψάρια.

Οι ρυθμοί που αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί δεν είναι ίδιοι σε κάθε υπόστρωμα ανάπτυξης, όπως η σάρκα διαφορετικών ειδών ψαριών. Επιπλέον, οι διαφορετικές γεωγραφικές θέσεις, η θερμοκρασία της θάλασσας, οι εποχιακές μεταβολές και η επεξεργασία (εκσπλαχνισμός ή φιλέτο κ.λπ.) επηρεάζουν την αρχική μικροχλωρίδα (Gram & Huss 1996), η οποία με τη σειρά της επηρεάζει τους παρατηρούμενους ρυθμούς ανάπτυξης που λαμβάνονται με τη χρήση επιλεκτικών μέσων. Είναι γνωστό ότι η αλλοίωση των νωπών ψαριών είναι κυρίως το αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Gram & Dalgaard 2002, Gram & Huss 1996), οι οποίοι παράγουν μεταβολίτες υπεύθυνους για τη παραγωγή δυσάρεστης οσμής και γεύσης, οδηγώντας τελικά στην οργανοληπτική απόρριψη των ψαριών.

Στην παρούσα μελέτη την ημέρα που προσδιορίστηκε ως εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων τσιπούρας στους  $2^{\circ}\text{C}$  (ημέρα 6, 144h) ο πληθυσμός για τα *Pseudomonas spp.* ανερχόταν σε  $7,85 \log \text{cfu/g}$  ενώ για τα υδροθειούχα ( $\text{H}_2\text{S}$ ) βακτήρια  $6,38 \log \text{cfu/g}$  και την ημέρα που απορρίφθηκαν ως αλλοιωμένα (ημέρα 9, 216h) οι πληθυσμοί των

μικροοργανισμών είχαν φτάσει για τα *Pseudomonas spp.* τα 9,4 log cfu/g και για τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια τα 8,49 log cfu/g. Ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων ιχθύων τσιπούρας στους -1,5 °C προσδιορίστηκε την ημέρα 15 (360h), όπου οι μικροβιακοί πληθυσμοί ήταν για τα *Pseudomonas spp.* 7,27 log cfu/g και για τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια 6,09 log cfu/g, ενώ οι μικροβιακοί πληθυσμοί την ημέρα απόρριψής τους (ημέρα 20, 480h) ανέρχονταν σε 8,6 log cfu/g για τα *Pseudomonas spp.* και 6,92 log cfu/g για τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια. Στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης των φιλέτων ήταν επίσης παρόντες οι μικροοργανισμοί *Enterobacteriaceae* και *Brochothrix thermosphacta*, όμως η ανάπτυξη και των δύο ήταν πιο αργή και έφτασαν σε χαμηλότερα επίπεδα πληθυσμού στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής αλλά και στη χρονική στιγμή της απόρριψης σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής στους 2 °C ο πληθυσμός των *Enterobacteriaceae* βρέθηκε να είναι 4,06 log cfu/g και των *Brochothrix thermosphacta* 4,51 log cfu/g, ενώ στους -1,5 °C οι πληθυσμοί για τους ίδιους μικροοργανισμούς βρέθηκαν να είναι 4,42 log cfu/g και 4,23 log cfu/g αντίστοιχα. Τη χρονική στιγμή που πραγματοποιήθηκε η απόρριψη των ιχθύων στους 2 °C τα βακτήρια του γένους *Enterobacteriaceae* έφτασαν τα 5,89 log cfu/g, και τα *Brochothrix thermosphacta* τα 6,05 log cfu/g, ενώ στους -1,5 °C έφτασαν 4,83 log cfu/g και 5,76 log cfu/g αντίστοιχα. Σύμφωνα με τις οδηγίες και μικροβιολογικές προδιαγραφές του ICMSF 33, η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX) των νωπών ψαριών δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> CFU g<sup>-1</sup>. Ωστόσο, η αλλοίωση των νωπών ψαριών γίνεται οργανοληπτικά ανιχνεύσιμη όταν η OMX είναι τόσο υψηλή όσο 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> CFU g<sup>-1</sup> (Gram & Huss 1996, Koutsoumanis & Nychas 1999). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος η OMX βρέθηκε να είναι στους 2 °C της τάξεως των 7,84 log cfu/g την ημέρα που προσδιορίστηκε ως εμπορικός χρόνος ζωής και 9,28 log cfu/g τη στιγμή της απόρριψης, ενώ στους -1,5 °C βρέθηκε να είναι 7,67 log cfu/g και 8,52 log cfu/g αντίστοιχα.

Από αυτά που αναφέρονται παραπάνω συμπεραίνεται ότι οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν ταχύτερα και στις δύο θερμοκρασίες (2 °C και -1,5 °C) όπου διατηρούνταν τα φιλέτα τσιπούρας είναι αυτοί του γένους *Pseudomonas* και οι επόμενοι σε μέγεθος πληθυσμού, που επίσης αναπτύσσονταν με γρήγορο ρυθμό, μικροοργανισμοί είναι τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένων και των *Shewanella putrefasciens*). Επομένως οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί ήταν οι *Pseudomonas spp.* και δευτερευόντως τα υδροθειούχα (H<sub>2</sub>S) βακτήρια

(συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*) και πράγματι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* αποτελούν το κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό αλλά και τον ειδικό αλλοιωγόνο μικροοργανισμό της τσιπούρας σύμφωνα με τους Koutsoumanis et al. (1999) και Koutsoumanis & Nychas (2000). Τα *Pseudomonas spp.* και δευτερευόντως η *Shewanella* αποτελούν τους κύριους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς της τσιπούρας σε ψύξη (Koutsoumanis 1999, Tryfinopoulou 2007) και γενικότερα τα *Pseudomonas spp.* έχουν αναγνωριστεί ως ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί στην τσιπούρα, αποθηκευμένη υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες σύμφωνα με τους Koutsoumanis et al. (1999), Parlapani et al. (2014), Parlapani et al. (2013) και Tryfinopoulou et al. (2002).

Τα ελαφρώς συντηρημένα προϊόντα ψαριών μπορεί επίσης να περιέχουν χαμηλά (10 cfu/g) ή υψηλά ( $10^6$ -  $10^7$  cfu/g) επίπεδα βακτηρίων του γένους *Enterobacteriaceae* και *Brochothrix thermosphacta* (Cann et al. 1984, Civera et al. 1984, Cory 1995, Leisner et al. 1994, Truelstrup Hansen et al. 1996).

Η τεχνολογία επεξεργασίας superchilling έχει αποδείξει αρκετά πλεονεκτήματα όσο αφορά την ποιότητα των προϊόντων διατροφής. Για παράδειγμα τα φιλέτα σολομού σε υπέρψυξη έχουν χαμηλότερα επίπεδα βακτηριδίων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φιλέτα σε ψύξη σύμφωνα με τους Hansen et al. (2009). Μελέτες σχετικά με την μέθοδο superchilling έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μπορεί να παρεμποδιστεί σημαντικά σε σύγκριση με τη συμβατική ψύξη (Magnussen et al. 2008) και αυτό αποδεικνύεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Οι Duun και Rustad (2007) διαπίστωσαν ότι τα φιλέτα μπακαλιάρου αποθηκευμένα σύμφωνα με τη μέθοδο superchilling στους  $-2,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  είχαν γενικά χαμηλότερους μικροβιακούς πληθυσμούς ( $5,2$ - $5,8\text{ log CFU/cm}^2$ ) κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης 6 εβδομάδων, σε σύγκριση με τα φιλέτα μπακαλιάρου που ήταν αποθηκευμένα σε ψύξη. Αυτό είναι κοντά στο αναφερόμενο επίπεδο αλλοίωσης ( $\text{log } 7\text{ CFU g}^{-1}$ ) από τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* σε προϊόντα μπακαλιάρου σε ψύξη (Gospavic et al., 2011).

Σύμφωνα με τους Zeng et al. (2005), οι γαρίδες που συντηρούνταν στους  $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  είχαν χαμηλότερα επίπεδα βακτηριδίων όσον αφορά την OMX σε σύγκριση με εκείνες που αποθηκεύτηκαν σε τριμμένο πάγο ( $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Στο τέλος της διάρκειας ζωής για τα φιλέτα τιλάπιας (*Oreochromis niloticus*) που ήταν αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες στους  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (13-15 ημέρες) και στους  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (20 ημέρες), η ολική μεσόφιλη

χλωρίδα (OMX) και οι αριθμοί των ψευδομονάδων έφθασαν τα  $\log 8 \text{ CFU g}^{-1}$ , ενώ οι ψευδομονάδες κυριαρχούσαν στην ολική χλωρίδα αλλοίωσης των φιλέτων τιλάπιας.

Τα βακτήρια αναπτύσσονται ταχύτερα κάτω από τον αέρα και υψηλότερη θερμοκρασία. Σύμφωνα με τους Parlapani et al. (2015a) φιλέτα τσιπούρας που φυλάσσονταν υπό αερόβιες συνθήκες στους  $0^\circ\text{C}$  και  $5^\circ\text{C}$  η αλλοίωση πραγματοποιήθηκε όταν η OMX έφθασε περίπου 8,3 και 8,6  $\log \text{ CFU g}^{-1}$  αντιστοίχως. Τα *Pseudomonas spp.* ήταν οι κύριοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που έφθασαν σε όλες τις περιπτώσεις τις υψηλότερες πληθυσμιακές πυκνότητες, μαζί με τα βακτήρια που παράγουν  $\text{H}_2\text{S}$  και τους μικροοργανισμούς *Enterobacteriaceae*. Τα φιλέτα τσιπούρας απορρίφθηκαν με οργανοληπτική αξιολόγηση όταν η OMX ήταν μεταξύ  $10^{7.5}$  και  $10^{8.5} \text{ CFU g}^{-1}$ . Παράλληλα η διάρκεια ζωής ολόκληρης εκσπλαχνισμένης τσιπούρας που φυλάσσονταν σε θερμοκρασία  $2^\circ\text{C}$  βρέθηκε να είναι 9 ημέρες, με τα *Pseudomonas spp.* να αποτελούν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό φθάνοντας το επίπεδο των 7,37  $\log \text{ cfu/g}$ , ακολουθούμενος από τα βακτήρια που παράγουν  $\text{H}_2\text{S}$  (7,03  $\log \text{ cfu/g}$ ). Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών *B. thermosphacta* και *Enterobacteriaceae* δεν ξεπερνούσαν τα 4,5  $\log \text{ cfu/g}$  (Parlapani et al. 2015b).

Οι Parlapani et al. (2014) διαπίστωσαν ότι στο τέλος της διάρκειας ζωής φιλέτων τσιπούρας αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες στους  $0^\circ\text{C}$ ,  $5^\circ\text{C}$  και  $15^\circ\text{C}$ , η OMX κυμαινόταν από 7,5 έως 8,5  $\log \text{ cfu/g}$ ., ενώ τα βακτήρια αυξάνονταν ταχύτερα κάτω από αερόβιες συνθήκες και υψηλότερη θερμοκρασία. Τα *Pseudomonas spp.* ήταν μεταξύ των κυρίαρχων μικροοργανισμών αλλοίωσης. Όσο υψηλότερη ήταν η θερμοκρασία τόσο υψηλότερη ήταν η μέγιστη πληθυσμιακή πυκνότητα των *Pseudomonas spp.*. Τα βακτήρια που παράγουν  $\text{H}_2\text{S}$  και τα *Enterobacteriaceae* ήταν επίσης συν-κυρίαρχα με τα *Pseudomonas spp.* σε μερικές από τις συνθήκες αποθήκευσης. Οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas spp.* βρέθηκαν να είναι οι ταχύτερα αναπτυσσόμενοι στην τσιπούρα, αποθηκευμένη στους  $5^\circ\text{C}$ , ενώ οι ρυθμοί ανάπτυξης δεν ήταν σημαντικά διαφορετικοί σε σύγκριση με άλλα βακτήρια αλλοίωσης στους  $0^\circ\text{C}$ . Στους  $15^\circ\text{C}$ , τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* ήταν τόσο γρήγορα αναπτυσσόμενα όσο τα *Pseudomonas spp.*. Τα βακτήρια *B. thermosphacta* ήταν τα βραδύτερα αναπτυσσόμενα στους  $0^\circ\text{C}$  και  $5^\circ\text{C}$ . Τα *B. thermosphacta* ήταν επίσης οι μικροοργανισμοί με τη μεγαλύτερη διάρκεια στη φάση προσαρμογής σε θερμοκρασίες ψύξης, ενώ τα βακτήρια που παράγουν  $\text{H}_2\text{S}$  δεν εμφάνισαν καθόλου φάση προσαρμογής σε όλες τις δοκιμασμένες θερμοκρασίες. Η μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού των *Pseudomonas spp.* ήταν σημαντικά υψηλότερη από άλλες βακτηριακές

ομάδες, ακολουθούμενες από τα βακτήρια που παράγουν  $H_2S$  και τα βακτήρια *Enterobacteriaceae*, ενώ τα βακτήρια *B. Thermosphacta* δεν κατόρθωσαν να φτάσουν σε υψηλό αριθμό ειδικά σε θερμοκρασίες ψύξης. Τα *Pseudomonas spp.* αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό. Πράγματι, σε πληθυσμιακό επίπεδο στο χρονικό σημείο απόρριψης, ο πληθυσμός των ψευδομονάδων ήταν σημαντικά υψηλότερος σε σύγκριση με άλλα βακτήρια αλλοίωσης. Οι δεύτεροι υψηλότεροι πληθυσμοί ήταν τα βακτήρια που παράγουν  $H_2S$  και τα *Enterobacteriaceae*. Η τσιπούρα απορρίφθηκε καθώς αλλοιώθηκε όταν η OMX έφθασε τα επίπεδα  $10^{7.5}$ - $10^{8.5}$  cfu g<sup>-1</sup>. Ο πληθυσμός των ψευδομονάδων ακολουθήθηκε από τα βακτήρια που παράγουν  $H_2S$  και τους πληθυσμούς *Enterobacteriaceae* σε όλες τις περιπτώσεις (0 °C, 5 °C και 15 °C). Οι πληθυσμοί των *B. Thermosphacta* παρέμειναν σε χαμηλότερα επίπεδα, ειδικά σε θερμοκρασίες ψύξης (Parlapani & Boziaris 2016).

Πράγματι, στο τέλος της διάρκειας ζωής λαβρακιού, αποθηκευμένου στους 2 °C υπό αερόβιες συνθήκες, τα *Pseudomonas spp.* και τα βακτήρια που παράγουν  $H_2S$  έφθασαν πληθυσμούς τόσο υψηλούς όσο 7,2 και 6,7 log cfu/g αντιστοίχως, ενώ τα βακτήρια *B. Thermosphacta* και *Enterobacteriaceae* παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα, καθώς έφθασαν περίπου τα 3,5 log cfu/g και κάτω από 2,5 log cfu/g, αντίστοιχα (Parlapani et al. 2015c).

Σύμφωνα με τους Parlapani et al. (2013) στην τσιπούρα αποθηκευμένη σε πάγο (0 °C) τα *Pseudomonas spp.* αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό και ο πληθυσμός τους ήταν υψηλότερος από αυτόν των βακτηρίων που παράγουν  $H_2S$  και των *Enterobacteriaceae*, καθ 'όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Οι μετρήσεις για τα βακτήρια *B. Thermosphacta* ήταν κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης ( $10^2$  cfu g<sup>-1</sup>) σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Η OMX ξεπέρασε τα 7 log cfu g<sup>-1</sup>, το οποίο θεωρείται ως το μέγιστο επίπεδο αποδοχής για τα ψάρια (Cakli et al. 2007), την ημέρα 10. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και από άλλους ερευνητές (Cakli et al. 2007, Koutsoumanis & Nychas 2000, Koutsoumanis et al. 1999). Ωστόσο, το προϊόν θεωρήθηκε αλλοιωμένο και απορρίφθηκε την 16η ημέρα, όταν η OMX και τα *Pseudomonas spp.* είχαν φτάσει τα 7,75 και 7,41 log cfu g<sup>-1</sup> αντίστοιχα.

Τα επίπεδα και ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού ήταν χαμηλότερα στα φιλέτα τσιπούρας που ήταν αποθηκευμένα στους -1,5 °C σε σύγκριση με αυτά στους 2 °C στη παρούσα πειραματική μελέτη. Αυτό είναι σύμφωνο με τους Huss (1995) και Church (1998) που ανέφεραν ότι τα επίπεδα του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε φιλέτα κατά την αποθήκευση στους -1 °C σε αερόβιες συνθήκες,

ήταν χαμηλότερα σε σύγκριση με αυτά που ήταν αποθηκευμένα στους 1 °C και συμπεράναν ότι αυτό οφείλεται στην αποτελεσματική καθυστέρηση της ανάπτυξης των βακτηρίων κατά την αποθήκευση σε συνθήκες υπέρψυξης. Μελέτες σχετικά με την υπέρψυξη έδειξαν εκτεταμένη διάρκεια ζωής των προϊόντων διατροφής σε σύγκριση με τη συμβατική ψύξη (Kaale et al. 2011) και αυτό συμβαδίζει και με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καθώς η διάρκεια ζωής των φιλέτων τσιπούρας ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη σε συνθήκες υπέρψυξης σε σχέση με την απλή ψύξη.

## 5. Συμπεράσματα

Η συντήρηση των τροφίμων είναι υψίστης σημασίας για την ασφάλεια και την αξιοπιστία των προϊόντων. Τα φρέσκα και υψηλής ποιότητας προϊόντα διατροφής, όπως τα ψάρια, είναι σε μεγάλη ζήτηση παγκοσμίως. Τα ψάρια είναι ιδιαίτερα ευπαθή και ευαλλοιώτα τρόφιμα, λόγω της βιολογικής τους σύνθεσης. Η υποβάθμιση αυτών οφείλεται κυρίως σε χημικές, ενζυμικές και βακτηριακές δραστηριότητες που οδηγούν στην απώλεια της ποιότητάς τους με επακόλουθο την αλλοίωσή τους. Η μικροβιακή ανάπτυξη αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα που περιορίζει τη διάρκεια ζωής και την ποιότητα των νωπών προϊόντων τροφίμων.

Στην παρούσα μελέτη έλαβε χώρα οργανοληπτική αξιολόγηση και μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων τσιπούρας. Τα φιλέτα συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες με δύο διαφορετικές μεθόδους συντήρησης, της ψύξης και της υπέρψυξης (μέθοδος superchilling), σε θερμοκρασία των 2 °C στην πρώτη και των -1,5 °C στη δεύτερη μέθοδο.

Συμπερασματικά, ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων τσιπούρας, που αποθηκεύτηκαν υπό αερόβιες συνθήκες, με χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων συντήρησης, της ψύξης και της υπέρψυξης (μέθοδος superchilling), σε θερμοκρασία 2 °C και -1,5 °C αντίστοιχα, φάνηκε να επεκτείνεται σε συνθήκες υπέρψυξης, καθώς οι μικροβιακές δραστηριότητες φαίνεται να επιβραδύνονται. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε ότι με τη χρήση της μεθόδου superchilling, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μπορεί να παρεμποδιστεί σημαντικά σε σύγκριση με τη συμβατική ψύξη με αποτέλεσμα εκτεταμένη διάρκεια ζωής και βελτιωμένη ποιότητα για τα προϊόντα διατροφής.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 6.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

**Abee T., Krockei L., Hill C. (1996)** Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbial*, 28: 169-185

**Alizadeh E., Chapleau N., De Lamballerie M., Le-Bail A. (2007)** Effect of different freezing processes on the microstructure of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 8:493–499

**AMEC. (2003)** Management of wastes from Atlantic seafood processing operations. AMEC Earth and Environmental Limited, Dartmouth, Nova Scotia, Canada

**Amos B. (2007)** Analysis of quality deterioration at critical steps/points in fish handling in Uganda and Iceland and suggestions for improvement. United Nations University, Uganda

**Ando M., Nakamura H., Harada R., Yamane A. (2004)** Effect of super chilling storage on maintenance of freshness of kuruma prawn. *Journal of Food Science and Technology Research*, 10(1):25–31

**Ashie I.N.A., Smith J.P., Simpson B.K. (1996)** Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36:87–121

**Audley M.A., Shetty K.J., Kinsella J.E. (1978)** Isolation and properties of phospholipase A from Pollock muscle. *J. Food Sci.*, 43:1771-1775

**Aune E.J. (2003)** Superchilling of foodstuff. A review, 21th Congress ICR, August 17–22, 2003, Washington, DC, <http://www.icr2003.org>

**Baird-Parker T.C. (2000)** The Production of Microbiologically Safe and Stable Foods. In: *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Lund, B.M. and T.C. Baird-Parker (Eds.). Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD., USA., pp: 3-18

**Beaufort A., Cardinal M., Le-Bail A., Midelet-Bourdin G. (2009)** The effects of superchilled storage at -2 °C on the microbiological and organoleptic properties of cold-smoked salmon before retail display. *International Journal of Refrigeration*, 32(7):1850–1857



- Bili M., Taoukis P.S. (2007)** Evaluation of shelf life of flavored dehydrated products using accelerated shelf life testing and the Weibull Hazard sensory analysis. *Developments in Food Science*, 40:627–637
- Bin F., Theodore P.L. (1993)** Shelf-life prediction: theory and application. *Food Control*, 4(3):125–133
- Borch E., Kant-Muemans M.-L., Blixt Y. (1996)** Bacterial spoilage of meat products and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1):103–120
- Boziaris I. (2014)** *Seafood Processing. Seafood quality assesment*, WILEY Blackwell, pp. 364-365
- Bréand S., Fardel G., Flandrois J.P., Rosso L., Tomassone R. (1997)** A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. *International Journal of Food Microbiology*, 38(2–3):157–167
- Cakli S., Kilinc B., Cadun A., Dincer T., Tolasa S. (2007)** Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18:391-397
- Cann D.C., Houston N.C., Taylor L.Y., Smith G.L., Thomson A.B., Craig A. (1984)** *Studies of Salmonids Packed and Stored Under a Modified Atmosphere*. Torry Research Station, Aberdeen, Scotland.
- Carlson C.J. (1969)** Superchilling fish – A review. In: Kreuzer R. (Ed.), *Freezing and irradiation of fish*. Fishing News Books Ltd., London, pp. 101–103
- Chun-hua W., Xing-qian Y., Chun-hong Y., Yaqin H., Shiguo C., Donghong L. (2014)** A critical review on superchilling preservation technology in aquatic product. *Journal of Integrative Agriculture*, 10:10-16
- Church N. (1998)** MAP fish and crustaceans-sensory enhancement. *Food Sci. Technol.*, 12:73–83
- Civera T., Parisi E., Amerio G.P., Giaccone V. (1995)** Shelf-life of vacuum-packed smoked salmon: microbiological and chemical changes during storage. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 46:13- 17
- Connell J.J. (1975)** *Control of Fish Quality*. Fishing News (Books) Ltd., London

**Constantin A.G. (1985)** Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. *International Journal of Food Microbiology*, 1(5):237–251

**Cyprian O., Lauzon H.L., Johannsson R., Sveinsdottir K., Arason S., Martinsdottir E. (2013)** Shelf life of air and modified atmosphere-packaged fresh tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets stored under chilled and superchilled conditions. *Food Science & Nutrition*, 1(2): 130–140

**Dalgaard P. (1995)** Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int. J. Food Microbiol.*, 26:319–333

**Dalgaard P. (2003)** Spoilage of seafood. In: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Academic Press, London, pp. 2462–2472

**Dalgaard P., Gram L., Huss H.H. (1993)** Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.*, 19:283–294

**Dalgaard. P. (1993)** Evaluation and prediction of microginl fish spoilage. PhD thesis, Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen.

**Doyle J.P. (1989)** Seafood Shelf Life as a function of temperature, Alaska Sea grant marine advisory program. <<http://www.nsgl.gso.uri.edu/aku/akug89005.pdf>>, retrieved on 6.9.2010

**Duun A.S., Hemmingsen A.K.T., Haugland A., Rustad T. (2008)** Quality changes during superchilled storage of pork roast. *LWT – Food Science and Technology*, 41(10):2136–2143

**Duun A.S., Rustad T. (2007)** Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets. *Food Chemistry*, 105:1067–1075

**Duun A.S., Rustad T. (2008)** Quality of superchilled vacuum packed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at –1.4 and –3.6°C. *Food Chem.*, 106:122–131

**Duy B.H.N., Arason S., Thorarinsdóttir K.A. (2007)** Effects of dry ice and superchilling on the quality and shelf life of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) fillets. *International Journal of Food Engineering*, 3(3):1–27

**Einarsson H. (1988)** Deep chilling (superchilling, partial freezing) – a literature survey. SIKs Service series (30) Goteborg Sweden. SIK – The Swedish Food Institute, Chalmers University of Technology

**FAO Fisheries and Aquaculture Department (2012)** FishStatJ – Software for Fishery Statistical Time Series. FAO, Rome

**FAO. (1986)** Fisheries Technical Papers-T142. The production of fish meal and oil. Fisheries Industries Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://www.fao.org/DOCREP/003/X6899E/X6899E00.HTM>

**FAO. (2005)** Post-harvest changes in fish. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy. <http://www.fao.org/fishery/topic/12320/en>

**Fik M., Surówka K., Leszczynska Fik A. (1988)** Application of superchilling to prolong the 836 keeping time of rainbow trout. Food/Nahrung, 32(3):291-300

**Fraser O., Sumar S. (1998)** Compositional changes and spoilage in fish. Nutr. Food Sci., 5:275-279

**Fukuma Y., Yamane A., Itoh T., Tsukamasa Y., Ando M. (2012)** Application of supercooling to long-term storage of fish meat. Fish. Sci., 78:451–461

**Gallart-Jornet L., Rustad T., Barat J.M., Fito P., Escriche I. (2007)** Effect of superchilled storage on the freshness and salting behavior of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. Food Chemistry 103(4):1268–1281

**Gardner G.A. (1981)** *Brocothrix thermosphacta* (*Micobacterium thermosphactum*) in the spoilage of meats: a review. In: T.A. Roberts et al. (editors). Psychotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity. Academic Press, London, pp. 139-173

**Gennari M., Tomaselli S., Cotrona V. (1999)** The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) Sea and stored in ice. *FoodMicrobiol* 16:15–28

**Ghaly A.E., Dave D., Budge S., Brooks M.S. (2010)** Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: Review. American Journal of Applied Sciences, 7:859-877

**Gill, C. O. (1996).** Extending the Storage Life of Raw Chilled Meats. Meat Science. Vol. 43, No. S, S99-S109

**Gould G.W. (1988)** In: R. Whittenburq. G.W. Gould, J.G. Banks and R.G. Board (editors), Homeo- static mechanisms in Microorganisms. Bath University Press, Bath, pp. 220-228

**Gram L. (1992)** Spoilage of three Senegalese fish species stored in ice at ambient temperature. In: E.H. Bligh (editor), Seafood Science and Technology. Fishing News Books, Blackwell, Oxford, pp. 225-233

**Gram L., & Dalgaard P. (2002)** Fish spoilage bacteria: problems and solutions. *Current Opinions in Microbiology*, 13:262-266

**Gram L., and Huss H.H. (1996)** Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.*, 33:121–137

**Gram L., Dalgaard P. (2002)** Fish spoilage bacteria: problems and solutions. *Current Opinions in Microbiology*, 13:262-266

**Gram L., Fonnesebech Vogel B. (2000)** *Shewanella*, p. 2008–2015. In R. Robinson, C. Batt, and P. Patel (ed.), *Encyclopedia of food microbiology*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif

**Gram L., Huss H.H. (2000)** Fresh and Processed Fish and Shellfish. In: *The Microbiological Safety and Quality of Foods*, Lund, B.M., A.C. Baird-Parker and G.W. Gould (Eds.). Chapman and Hall, London, ISBN: 10: 0834213230, pp: 472-506

**Gram L., Trolle G., Huss H.H. (1987)** Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 4:65–72

**Hansen A.A., Morkore T., Rudi K., Langsrud O., Eie T. (2009)** The combined effect of superchilling and modified atmosphere packaging using CO<sub>2</sub> emitter on quality during chilled storage of pre-rigor salmon fillets (*Salmo salar*). *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 89(10):1625-1633

**Hansen T.L., Gill T., Rontved S.D., Huss H.H (1996)** Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Res. Int.*, 29:181-186

**Hayes P.R. (1985)** *Food Microbiology and Hygiene*. Elsevier. London, pp. 80- 139

**Herbert R.A., Hendrie M.S., Gibson D.M., Shewan J.M. (1971)** Bacteria active in spoilage of certain seafoods. *J. Appl. Bacteriol.*, 34:41–45

- Howgate P. (1982)** Quality Assessment and Quality Control. In: A. Aitken et al. (Eds.), Fish Handling and Processing (2nd edition). Her Majesty's Stationary, Edinburgh, pp. 177-186
- Howgate, P., Johnston, A., Whittle, K.J. (Eds.). (1992)** Multilingual Guide to EC Freshness Grades for Fishery Products. Marine Laboratory. Scottish Office of Agriculture. Environment and Fisheries Department. Aberdeen.
- Huis in't Veld H.J.J. (1996)** Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. International Journal of Food Microbiology, 33:1- 18
- Huis in't Veld J.H.J., Mulder R.W.A.W., Snijders, J.M.A. (1994)** Impact of animal husbandry and slaughter technologies on microbial contamination of meat: monitoring and control. Meat Sci., 36:123-154
- Huss H. H. (1995)** Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical
- IFST. (1993)** "Shelf life of foods: guidelines for its determination and prediction. 1st Ed". Institute of Food Science and Technology: London
- Jeremiah L.E. (1980)** Effect of frozen storage and protective wrap upon the cooking losses, palatability, and rancidity of fresh and cured pork cuts. J. Food Sci., 45:187–196
- Johnston W.A., Nicholson F.J., Roger A. (1994)** Freezing and refrigerated storage in fisheries. FAO Fisheries Technical Paper-T340, Rome, Italy.  
<http://www.fao.org/DOCREP/003/V3630E/V3630E00.HTM>
- Jorgensen B.R., Gibson D.M., Huss H.H. (1988)** Microbiological quality and shelf-life prediction of chilled fish. Int. J. Food Microbiol., 6:295–307
- Jorgensen B.R., Huss H.H. (1989)** Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. Int. J. Food Microbiol., 9:51–62
- Kaale L.D., Eikevik T.M., Rustad T., Kolsaker K. (2011)** Superchilling of food: A review. J. Food Eng., 107:141–146
- Kilcast D., Subramaniam P. (2000)** Stability and shelf life of food. Leatherhead Food Research Association, <[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=14](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=14)>, retrieved on 12.8.2010
- Kim W.J., (1993)** Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservative. Food Rev. Int., 9:299-313

**Koutsoumanis K., Lampropoulou K., Nychas G.-J.E. (1999)** Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream stored aerobically at 0, 8 and 15 °C. *Journal of Food Protection*, 62:398-402

**Koutsoumanis K., Nychas G.J.E. (1999)** Chemical and Sensory Changes Associated with Microbial Flora of Mediterranean Boque (Boops boops) Stored Aerobically at 0, 3, 7, and 10 °C. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 698–706

**Koutsoumanis K., Nychas G.-J.E. (2000)** Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf-life predictions. *International Journal of Food Microbiology*, 60:171-184

**Kyrana V.R., Lougovois V.P., Valsamis D.S. (1997)** Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 32:339-347

**Lauzon H.L. (1997)** Shelf-life and Bacteriological Spoilage of American Plaice (*Hippoglossoides platessoides*). M. Sc. Thesis, University of Iceland, Faculty of Science, Dept. of Food Science, October 1997, 61 p.

**Lauzon H.L. (2000)** Chapter 25. Shelf-life and Bacteriological Spoilage of American Plaice (*Hippoglossoides platessoides*). In: F. Shahidi (Ed.), *Seafood in Health and Nutrition, Transformation in Fisheries and Aquaculture: Global Perspectives*. A ScienceTech book, St. John's, NF, Canada, pp. 327-354; ISBN No. 0-9683220-1-8

**Leisner J.J., Gram L.(1999)** Spoilage of fish, in *Encyclopedia of Food Microbiology*, ed. by Robinson RK, Batt CA and Patel PD. Academic Press, San Diego, CA, pp. 813–820

**Leisner J.J., Millan J.C., Huss H.H., Larsen, L.M. (1994)** Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar-salted fish. *J. Appl. Bacterial*, 76:417-423

**Lougovois V.P., Kyranas E.R., Kyrana V.R. (2003)** Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International*, 36:551-560

**Magnussen O.M., Haugland A., Hemmingsen A.K.T., Johansen S., Nordtvedt T.S. (2008)** Advances in superchilling of food - Process characteristics and product quality. Trends In Food Science & Technology, 19(8):418-424

**Martinsdóttir E., Lauzon H.L., Tryggvadóttir S.V. (2005)** Áhrif roðkælingar á gæði fiskflaka. Verkefnaskýrsla/Project Report 10-05, Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins/Icelandic Fisheries Laboratories, Reykjavík, Iceland, pp. 50 (in Icelandic)

**Mossel D.A.A., Corry J.E.L., Struijk, C.B., Baird R.M. (1995)** Essentials of the Microbiology of Foods: a textbook for advanced studies. Wiley, England, pp. 175-214

**Oehlenschläger J. (2010a)** Introduction – Importance of analysis in seafood and seafood products, variability and basic concepts, in *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis* (eds L.M.L. Bollet and F. Toldra). CRS press, Boca Raton, pp. 3-10

**Oehlenschläger J. (2010b)** Minerals and trace elements in *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis* (eds L.M.L. Bollet and F. Toldra). CRS press, Boca Raton, pp. 352-376

**Oehlenschläger J., Sorensen N.K. (1997)** Criteria of seafood freshness and quality aspects, in Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry. International Institute of Refrigeration, Paris, pp. 30-35

**Olafsdóttir A., Margeirsson B., Sveinsdóttir K. (2012)** Effect of superchilled processing of whole whitefish—pre rigor[J]. Matis report

**Olafsdóttir G., Lauzon H.L., Martinsdóttir E., Oehlenschläger J., Kristbergsson K. (2006)** Evaluation of shelf life of superchilled cod (*Gadus morhua*) fillets and the influence of temperature fluctuations during storage on microbial and chemical quality indicators. Journal of Food Science, 71(2):97–109

**Ólafsdóttir G., Martinsdóttir E., Oehlenschläger J., Dalgaard P., Jensen B., Undeland I., Mackie I.M., Henehan G., Nielsen J., Nilsen H. (1997)** Methods to evaluate fish freshness in research and industry. Trends F. Sci. Technol., 8:258-265

**Ozogul F., Kuley E., Ozogul Y. (2007)** Sensory, chemical and microbiological quality parameters in sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice or wrapped in cling film or in

aluminium foil at  $2 \pm 1$  °C. *International Journal of Food Science and Technology*, 42:903-909

**Parlapani F.F., Boziaris S.I. (2016)** Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, 66:553-559

**Parlapani F.F., Haroutounian A.S., Nychas E.G.J., Boziaris S.I. (2015c)** Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2 °C. *Food Microbiology* 50:44-53

**Parlapani F.F., Kormas Ar.K., Boziaris S.I. (2015a)** Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 2386–2394

**Parlapani F.F., Mallouchos A., Haroutounian A.S., Boziaris S.I. (2014)** Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 189:153–163

**Parlapani F.F., Mallouchos A., Haroutounian A.S., Boziaris S.I. (2017)** Volatile organic compounds of microbial and non-microbial origin produced on model fish substrate un-inoculated and inoculated with gilt-head sea bream spoilage bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 78:54-62

**Parlapani F.F., Meziti A., Kormas Ar.K., Boziaris S.I. (2013)** Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiology*, 33:85-89

**Parlapani F.F., Verdos I.G., Haroutounian A.S., Boziaris S.I. (2015b)** The dynamics of *Pseudomonas* and volatiles during the spoilage of gutted sea bream stored at 2 °C. *Food Control*, 55:257-265

**Rahelic´ S., Puac S., Gawwad A.H. (1985)** Structure of beef longissimus dorsi muscle frozen at various temperatures: Part 1 – histological changes in muscle frozen at –10, –22, –33, –78, –115 and –196°C. *Meat Sci.*, 14:63–72

**Sampels S. (2015)** The Effects Of Storage And Preservation Technologies On The Quality Of Fish Products: A Review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39:1206–1215



- Sivertsvik M., Rosnes J.T., Kleiberg G.H. (2003)** Effect of modified atmosphere packaging and superchilled storage on the microbial and sensory quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fillets. *Journal of Food Science*, 68(4):1467–1472
- Stiles M.E., Hastings J.W. (1991)** Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.*, 2:247-251
- Truelstrup Hansen L., Gill T., Drewes Røntved S., Huss H.H. (1996)** Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Res. Int.* (submitted).
- Truelstrup Hansen, L. (1995)** Quality of Chilled, Vacuum-packed Cold-smoked Salmon. Ph.D. Thesis. Danish Institute for Fisheries Research and The Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen, Denmark.
- Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Nychas G.- J.E. (2002)** Characterization of *Pseudomonas spp.* associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:65–72
- Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Vancanneyt M., Hoste B., Swings J., Nychas G.- J.E. (2007)** Diversity of *Shewanella* population in fish *Sparus aurata* harvested in the Aegean Sea. *J. Appl. Microbiol.*, 103:711–721
- Tsironi T., Salapa I., Taoukis P. (2009)** Shelf life modelling of osmotically treated chilled gilthead seabream fillets. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10:23–31
- Tsironi T.N., Taoukis P.S. (2011)** Shelf life extension of gilthead seabream fillets by osmotic treatment and antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.*, 112:316–328
- Vogel F.B., Venkateswaran K., Satomi M., Gram L. (2005)** Identification of *Shewanella baltica* as the Most Important H<sub>2</sub>S-Producing Species during Iced Storage of Danish Marine Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 10:1128
- Yorkowski M., Brockerhoft H. (1965)** Lyso lecthinase of cod muscle. *J. Fish Res.*, 22:643-652
- Zeng M.Y., Huang H. (2001)** Quality changes of *Lateolabrax japonicus* meat during partially frozen storage., vol. 8 (pp. 67-69)

**Zeng Q.Z., Thorarinsdottir K.A., Olafsdottir G. (2005)** Quality changes of shrimp (*Pandalus borealis*) stored under different cooling conditions. Journal Of Food Science, 70(7):459-466

## **6.2. Ηλεκτρονική βιβλιογραφία**

[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=647901#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=647901#null)

<http://fishbase.org/summary/Sparus-aurata.html>

[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus\\_aurata/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en)

<http://www.doh.wa.gov/CommunityandEnvironment/Food/Fish/HealthBenefits>

[http://www.disigma.gr/media/blfa\\_files/chapter\\_YGIEINH\\_BIOMHXANIVN\\_TROFIMVN.pdf](http://www.disigma.gr/media/blfa_files/chapter_YGIEINH_BIOMHXANIVN_TROFIMVN.pdf)

[http://www.disigma.gr/media/blfa\\_files/chapter\\_YGIEINH\\_BIOMHXANIVN\\_TROFIMVN.pdf](http://www.disigma.gr/media/blfa_files/chapter_YGIEINH_BIOMHXANIVN_TROFIMVN.pdf)

<http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5989e/x5989e01.htm>

## **6.3. Ελληνική βιβλιογραφία**

**Κλαουδάτος Σ. Α., Κλαουδάτος Α. Σ. (2012)** Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφή υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Κεφάλαιο 3: Αναπαραγωγή – εκτροφή ιχθύων θαλασσίων υδάτων. Εκτροφή ευρύαλων ειδών ιχθύων. 228-231. Εκδόσεις Προπομπός

## 7. ABSTRACT

Fish are one of the most important value-added products of the food market. Fresh fishery products are highly perishable. Fish storage at low temperatures is the most common storage mean used, in order to delay the spoilage of fresh fish. Fish spoilage occurs because of the microbial activity, chemical oxidation and autolysis. Microbial spoilage is the major cause of fresh seafood quality deterioration, while spoilage is caused by a fraction of the total initial microbiota called specific spoilage organisms (SSOs).

In this study, sensory and microbiological changes of sea bream fillets (*Sparus aurata*), stored under aerobic conditions using two different methods of food preservation, cooling and super chilling, at 2 °C and -1.5 °C respectively, were carried out in order to assess their quality and shelf-life. After sensory evaluation, the self-life of seabream fillets was determined at 6 days (144h) for fillets stored at 2 °C and at 15 days (360h) for fillets stored at -1,5 °C. *Pseudomonas spp.* and H<sub>2</sub>S producing bacteria (*Shewanella spp.*) were among the dominant spoilage microorganisms under both storage conditions of sea bream fillets. *Enterobacteriaceae* and *Brochothrix thermosphacta* were as well part of the microbial flora of the fillets, but they did not reach as high population levels as the above-mentioned microorganisms. Total mesophilic counts were 7.84 log cfu/g and 7.67 log cfu/g for the fillets stored at 2 °C and -1.5 °C after 6 days (144h) and 15 days (360h) of storage, respectively. Finally, the different storage temperatures seem to have affected the growth rates of microorganisms, the sensory characteristics as well as the shelf-life of sea bream fillets.

**Keywords:** Sea bream (*Sparus aurata*), Shelf-life, Chilling, Superchilling, Spoilage, Specific Spoilage Organisms (SSOs).

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

**Πίνακας 12:** Πληθυσμοί (MO log cfu/g) των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν σε φιλέτα τσιπούρας (n=2) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 °C) (Παρτίδα 1).

Χρόνος (ημέρες)	VRBGA	STAA	CFC	IA	TSA
0	1	1	4,36	1	5,14
3	1,59	1	6,12	5,37	5,4
6	3,6	4,33	7,68	6,32	7,8
9	5,2	5,78	9,64	8,43	9,56
12	7,38	6,45	9,15	8,17	9,31
15	7,43	7,02	8,95	6,73	9,47

**Πίνακας 13:** Πληθυσμοί (MO log cfu/g) των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν σε φιλέτα τσιπούρας (n=2) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες υπέρψυξης (-1,5 °C) (Παρτίδα 1).

Χρόνος (ημέρες)	VRBGA	STAA	CFC	IA	TSA
0	1	1	4,36	1	5,14
5	3,92	1	5,99	4,22	5,96
10	3,09	1	6,45	3,57	7,96
15	4,51	3,84	6,63	5,57	7,15
20	4,52	5,94	8,64	7,15	8,54
25	4,87	5,58	9,52	6,24	9,3

**Πίνακας 14:** Πληθυσμοί (MO log cfu/g) των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν σε φιλέτα τσιπούρας (n=2) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 °C) (Παρτίδα 2).

Χρόνος (ημέρες)	VRBGA	STAA	CFC	IA	TSA
0	2,65	2,15	4,8	3,06	5,15
3	3,33	2,15	6,27	4,94	6,19
6	4,51	4,69	8,02	6,45	7,89
9	6,24	6,19	9,17	8,54	9,14
12	7,6	5,69	9,29	9,59	9,45
15	7,62	7,14	8,99	6,8	9,44

**Πίνακας 15:** Πληθυσμοί (MO log cfu/g) των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν σε φιλέτα τσιπούρας (n=2) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες υπέρψυξης (-1,5 °C) (Παρτίδα 2).

Χρόνος (ημέρες)	VRBGA	STAA	CFC	IA	TSA
0	2,65	2,15	4,8	3,06	5,15
5	3,47	2	5,99	4,24	5,85
10	3,55	3,86	8,08	6	7,25
15	4,33	4,63	7,91	6,62	8,19
20	5,14	5,62	8,59	6,67	8,51
25	4,9	5,5	9,49	6,28	9,42